

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRÔNOMICO

Vol. 9 Campinas, Janeiro-Abril de 1949 N.^{os} 1-4

SUMÁRIO

	Pág.
MUTAÇÕES EM <i>COFFEA ARABICA</i> L.	1
C. A. KRUG	
AGENTES DE POLINIZAÇÃO DA FLOR DO CAFEIEIRO (<i>COFFEA ARABICA</i> L.)	11
A. CARVALHO e C. A. KRUG	
OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM <i>COFFEA</i> . XII — UMA NOVA FORMA TETRAPLÓIDE	25
A. J. T. MENDES	
INTRODUÇÃO AO ESTUDO DA AUTO-ESTERILIDADE NO GÊNERO <i>COFFEA</i>	35
CÂNDIDA H. T. MENDES	
UM ENROLAMENTO DAS FÓLHAS DO FUMO DE CAUSA GENÉTICA	43
A. S. COSTA e R. FORSTER	
OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM <i>COFFEA</i> . XIII — OBSERVAÇÕES PRELIMINARES EM <i>COFFEA ARABICA</i> L. VAR. <i>RUGOSA</i> K. M. C.	47
DIXIEE M. MEDINA	
OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM <i>DYSDERCUS</i> . CADEIAS DE CROMOSSÔMIOS EM TECIDO SOMÁTICO DE <i>DYSDERCUS MENDESI</i> BLOETE (<i>HEMIPTERA-PYRRHOCORIDAE</i>)	53
LUIZ O. T. MENDES	
INVESTIGAÇÕES SOBRE A TRISTEZA DOS <i>CITRUS</i> . II — CON. CEITOS E DADOS SOBRE A REAÇÃO DAS PLANTAS CÍTRICAS À TRISTEZA	59
A. S. COSTA, T. J. GRANT e S. MOREIRA	

Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo
Departamento da Produção Vegetal

CAIXA POSTAL, 28 — CAMPINAS

Estado de São Paulo — Brasil

DEPARTAMENTO DA PRODUÇÃO VEGETAL

DIRETOR GERAL : — Teodoreto de Camargo

Divisão de Experimentação e Pesquisas

INSTITUTO AGRONÔMICO

DIRETOR INTERINO : — C. A. Krug

SUBDIVISÕES

SUBDIVISÃO DE GENÉTICA : — A. Carvalho (substituto).

Secção de Genética : — A. Carvalho, A. S. Costa, C. S. Novais Antunes, H. Antunes Filho, M. J. Purchio, O. S. Neves, E. B. Gerneck, M. P. Penteado.

Secção de Citologia : — A. J. T. Mendes, C. H. T. Mendes, Dixier M. Medina.

Secção de Introdução de Plantas Cultivadas : — L. A. Nucci (substituto).

SUBDIVISÃO DE HORTICULTURA : — S. Moreira.

Secção de Citricultura e Plantas Tropicais : — S. Moreira, J. Ferreira da Cunha, O. Galli, F. Girão Carvalho, J. Soubihe Sobrinho.

Secção de Olericultura e Floricultura : — O. de Toledo Prado, H. P. Krug, L. de Sousa Camargo, S. Alves.

Secção de Viticultura e Frutas de Clima Temperado : — J. R. A. Santos Neto, O. Rigitano, O. Zardeto de Toledo, P. V. C. Bittencourt.

SUBDIVISÃO DE PLANTAS TÊXTEIS : — I. Ramos.

Secção de Algodão : — I. Ramos, V. Lazzarini, V. Schmidt, H. de Castro Aguiar, E. S. Martinelli, P. A. Cavaleri.

Secção de Plantas Fibrosas Diversas : — J. C. Medina, F. A. Correia, G. de Paiva Castro.

SUBDIVISÃO DE ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS : — E. P. Guião.

BRAGANTIA

Redação Técnica : A. Carvalho e A. Pais de Camargo.

Redação : B. Cavalcante Pinto e Ciro Alves Mourão.

Os manuscritos são apreciados por técnicos dâste Instituto, especializados no assunto. Os resumos em inglês foram revistos por gentileza do Dr. T. J. Grant.

Assinatura anual, Cr\$ 50,00. — Para agrônomos, 50% de abatimento.

Tôda correspondência deve ser dirigida à Redação de BRAGANTIA — Caixa postal 28
CAMPINAS — Est. de São Paulo — BRASIL.

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRÔNOMICO

Vol. 9

Campinas, Janeiro-Abril de 1949

N.^{os} 1-4

MUTAÇÕES EM *COFFEA ARABICA* L. ⁽¹⁾

C. A. KRUG

Engenheiro agrônomo, Diretor do Instituto Agrônomo de Campinas

1—INTRODUÇÃO

Por ocasião da realização da Primeira Semana de Genética, em 1943, tivemos oportunidade de apresentar, em colaboração com o nosso colega A. J. T. Mendes, um resumo dos trabalhos sobre a genética do cafeeiro, em andamento na Subdivisão de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas. Não pretendíamos novamente abordar este assunto na presente "Semana de Genética", pois, como sabem, o cafeeiro constitui material ingrato para pesquisas dessa natureza, exigindo muito tempo para a sua conveniente realização. Nesse intervalo, de pouco mais de cinco anos, nenhuma descoberta nova de interesse especial foi feita, apenas completando-se uma série de resultados parciais. Quiseram, entretanto, os organizadores desta "Semana" prestar uma homenagem especial a esta planta, à qual São Paulo e o Brasil tanto devem, constituindo-a tema principal da primeira das quatro conferências que aqui serão pronunciadas. Assim, não pudemos esquivar-nos de aceitar a incumbência que nos foi dada. Relataremos, a seguir, após ligeira introdução — durante a qual pedimos vênica para repetir algumas informações já expendidas em outras ocasiões — alguns aspectos da genética do cafeeiro, que reputamos de especial interesse para os nossos trabalhos.

Como é do conhecimento geral, tais pesquisas foram iniciadas em 1932 e constituem setor de um programa então elaborado, que inclui estudos sobre a biologia da flor, pesquisas citológicas e a execução de um vasto plano de melhoramento do cafeeiro, seja pelo isolamento de linhagens aperfeiçoadas, seja pela síntese de novos tipos pela hibridação intra e interespecífica. Trata-se de serviços realizados por uma equipe de engenheiros agrônomos, sendo justo aqui destacar o nome de Alcides Carvalho, principal executor dos trabalhos de genética e de melhoramento, há alguns anos, eficientemente auxiliado por Hermindo Antunes Filho. Valiosa também tem sido a colaboração prestada pelo colega José E. T. Mendes, chefe da

⁽¹⁾ Conferência pronunciada na sessão de abertura da Segunda Semana de Genética, realizada na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, de 8 a 12 de fevereiro de 1949. As ilustrações apresentadas foram aqui omitidas.

Secção de Café. Os resultados mais adiante relatados foram, pois, obtidos em pesquisas realizadas em íntima cooperação com outros engenheiros agrônomos, contendo muitas informações ainda não publicadas.

2—MUTAÇÕES EM *C. ARABICA*

O estudo de mutações tem constituído, sem dúvida, a principal preocupação da grande maioria dos geneticistas. Representam a matéria prima para a evolução, e o homem lança mão daquelas de interesse econômico para o melhoramento das plantas e animais domésticos. Abrangendo hoje a sua definição, segundo Dobzhansky, “tôda e qualquer modificação que conduz a uma mudança nas estruturas auto-reprodutoras”, conclui-se que, sob êste aspecto, as mutações abrangem variações de natureza a mais variável, incluindo, além de mudanças nos gens e cromossômios, também modificações ocorridas no citoplasma e seus constituintes, plasmagens, etc., que desempenham papel na diferenciação dos organismos.

Por ocasião do Oitavo Congresso Internacional de Genética, recentemente reunido em Estocolmo, tivemos ocasião de discorrer sobre uma série de mutantes do cafeeiro, particularmente de *C. arabica*, que vêm sendo estudados em Campinas. Além de fornecer elementos para a elucidação de uma série de problemas teóricos, tais estudos vêm contribuindo para um melhor conhecimento da estrutura genética das variedades de café, e, além disso, orientam a escolha dos melhores métodos de melhoramento.

Antes de discutir certos aspectos especiais de alguns dêstes mutantes, classifiquemo-los, primeiro, a título de elucidação geral, em gênicos, cromossômicos e citoplásmicos. Dêstes, os gênicos podem ainda ser agrupados de acôrdo com os órgãos da planta que afetam, com o grau de dominância, salientando-se o fato de alguns dêles serem instáveis.

2.1—CLASSIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES

2.1.1—MUTAÇÕES GÊNICAS

Como era de esperar, predominam, também em café, as mutações gênicas. Mais de duas dezenas delas se acham em estudos, encontrando-se praticamente terminada a análise genética de dezoito dessas mutações. Foram encontradas em viveiros e em culturas de café, constituindo, algumas delas, variedades cultivadas no Brasil e também em outros países cafeeiros. Afetam quase todos os caracteres das plantas, desde o porte e tipo de ramificação, até os característicos de folhas, flores, frutos e sementes. Tôdas as variações até hoje estudadas, com exceção do “mokka”, são controladas, cada uma, por um único par de gens principais. Estudando-se a ação de cada um dêles, verifica-se que há uma acentuada tendência para a pleiotropia (quadro 1). Assim, dos dezoito gens estudados, aparentemente apenas dois afetam, cada um, um único caráter: o gen *Br*, *bronze*, que é responsável pela coloração escura das folhas novas, e o gen *ce*, *cêra*, que determina uma coloração amarela do endosperma das sementes de café. Todos os demais gens afetam de dois até catorze caracteres principais, tais como, por exemplo, o fator *an*, *anômala*, que modifica o porte das plantas, o tipo da ramificação

QUADRO 1.—Principais caracteres afetados em diversas das mutações em estudo em *C. arabica* L. (1)

Denominação	Símbolo	Porte	Caule	Ramos	Direção dos ramos	Fólias			Hábito de flores- cimento	Flores				Frutos		Sementes		Produti- vidade (2)	N.º dos caracte- res afetados		
						Tamanho	Forma	Cór		Tamanho	Cór da pétala	Cálice	Número Órgãos	Cór	Tamanho	Forma	Cór			Tamanho	Forma
Bronze	Br/br	x		x														x (-)	10		
Calycanthema (Cc)	Cc			x															x (-)	1	
Cera	Cc/c																			12	
Anômala	An/an	x		x		x	x												x (-)	8	
Angustifolia	Ag/Ag	x				x	x												x (-)	14	
Purpureasens	Pp/Pr	x				x	x												x (-)	2	
Xanthocarpa	Xc/Xc	x				x	x												x (+)?	2	
Semperflorens.	Sl/sl	x				x	x												x ?	5	
Anormalis.	An/an	x		x		x	x												x (-)	9	
Cattura.	Ct/ct	x		x		x	x												x (+)?	5	
Fasciado	Fs/fs	x		x		x	x												x (-)	12	
Sépulas desenvolvíveis	Sd/sd	x		x		x	x												x (-)	4	
Mangiope	Mg/mg	x		x		x	x												x (-)	9	
Laurina.	Lr/Lr	x		x		x	x												x (+)?	9	
Mokka	Mk/mk	x		x		x	x												x (-)	10	
Erecta	Er/er	x																	x (-)	3	
Bourbon (NaNa)	Na/Na	x		x			x												x (+)	5	
Murta (Nana)	Na/Na	x				x	x												x (-)	4	
Anão (nana)	Na/Na	x		x		x	x												x (-)	6	
Grêspa (Grr)	Grr/Grr	x				x	x												x (-)	11	
TOTAL		16	3	12	2	13	13	2	1	1	8	1	2	3	7	8	9	1	9	17	

(1) Neste quadro não foi incluído o fator *typica*, *T/t*, existente na forma *typica*, com a qual todas as outras variações são comparadas.

(2) O sinal (—) significa diminuição de produtividade; (+) significa aumento.

lateral, o tamanho das flores e o número de óvulos — verificando-se acentuada tendência para a poliembrionia falsa — o tamanho e a forma dos frutos e das folhas, além de afetar a produção. Ação nitidamente pleiotrópica também exercem, entre outros, os gens *C*, *calycanthema*, *pr*, *purpurascens*, *Fs*, *fasciação*, *Cr*, *crêspa* e *mo*, *mokka*. Dezesseis destes gens influenciam a produtividade e o porte das plantas, e três deles afetam, respectivamente, a cor das pétalas, a cor do endosperma e a cor das folhas maduras. Conclui-se daí que a multiplicidade de ação dos gens mutantes é bastante variável, variando também a intensidade com que os diferentes caracteres da planta são afetados pelos gens em questão.

De especial interesse se apresentam também os resultados que se obtêm pela classificação dos dezoito gens, de acordo com o grau de dominância. Comparando-se com os alelos existentes na forma considerada como normal, que é *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer (café nacional), conclui-se que cinco são dominantes, seis são recessivos e sete acusam dominância incompleta, isto é, o híbrido F_1 apresenta o respectivo característico em grau intermediário, conforme a seguinte relação:

DOMINANTES	DOMINÂNCIA INCOMPLETA	RECESSIVOS
<i>C</i> — calycanthema	<i>Am</i> — anormalis	<i>ag</i> — angustifolia
<i>Ct</i> — caturra	<i>Br</i> — bronze	<i>an</i> — anômala
<i>Cr</i> — crêspa	<i>Mo</i> — mokka	<i>ce</i> — cêra
<i>Er</i> — erecta	<i>Na</i> — nana	<i>lr</i> — laurina
<i>Mg</i> — maragogipe	<i>Fs</i> — fasciação	<i>pr</i> — purpurascens
	<i>Sd</i> — Sépala desenvolvidas	<i>sf</i> — semperflorens
	<i>Xc</i> — xanthocarpa	

Conclui-se, pois, que dois terços dos gens estudados são ou dominantes sobre os alelos normais, ou acusam dominância incompleta em F_1 .

Quanto à estabilidade destes gens, verifica-se que a grande maioria se apresenta bem estável, apenas dois deles acusando certo grau de instabilidade: são os gens *xc*, *xanthocarpa* e *na*, *nana* que, no tecido somático, mutam, às vezes, nos dois sentidos, isto é, de recessivo a dominante, e, raríssimas vezes, de dominante a recessivo.

2.1.2—MUTAÇÕES CROMOSÔMICAS

As mutações cromosômicas são relativamente pouco frequentes nesta espécie de 44 cromossomos somáticos, tendo-se encontrado nos viveiros e em culturas, durante estes dezesseis anos, apenas alguns exemplares de *monosperma*, com 22 cromossomos, e outros do tipo *bullata*, com 66 ou 88 cromossomos somáticos. Estes últimos são devidos a anomalias na formação dos gametas, devendo o *monosperma* originar-se em virtude de um desenvolvimento partenogenético, a partir de uma oosfera normal de 22 cromossomos.

2.1.3—MUTAÇÕES CITOPLÁSMICAS

Apenas uma única variação foi até hoje encontrada, uma variação nas folhas, cujo mecanismo hereditário não segue as leis mendelianas, pois se trata de um caso típico de hereditariedade citoplásmica. A variação

não é transmitida pelo pólen, só aparecendo em percentagens variáveis, na descendência da própria planta variegada e nos seus híbridos com plantas normais, quando estas contribuem com o pólen.

2.1.4—MUTAÇÕES SOMÁTICAS

Observam-se, também, vários casos de mutações somáticas, tanto gênicas, cromossômicas, como citoplásmicas, que têm sido propagadas por enxertia ou por sementes.

3—ALGUNS CASOS DE INTERAÇÃO DE FATORES

Passemos agora a relatar cinco casos de interação de alguns dos fatores genéticos atrás mencionados.

3.1—GOIABA (*sdsd*) x CALYCANTHEMA (*Cc*)

Como já expusemos anteriormente, os gens *sd*, da variedade goiaba, e *C*, da variedade *calycanthema*, ocasionam uma profunda modificação no cálice, órgão floral que, nos tipos comuns de café, só existe em estado rudimentar. Flores de plantas homozigotas recessivas (*sdsd*) apresentam um cálice foliáceo, mais ou menos desenvolvido, que persiste até a maturação completa do fruto. O F_1 com o tipo normal é intermediário, isto é, apresenta flores com sépalas menores. Em F_2 obtém-se segregação de 1:2:1.

O fator dominante *C* provoca o aparecimento de um cálice petalóide bem desenvolvido, fazendo com que a flor pareça possuir duas corolas. Só se conhecem, desta mutação, plantas heterozigotas (*Cc*), que são quase completamente estéreis pelo lado feminino.

De interesse se nos afigurou cruzar estes mutantes, a fim de verificar qual o tipo de interação que os dois gens em questão manifestariam.

Uma planta *calycanthema* (*Cc*) foi cruzada tanto com indivíduos homozigotos como heterozigotos, para o gen *sd*. No primeiro caso o F_1 deveria ser heterozigoto para este gen, sendo metade dos indivíduos homozigotos para *cc*, e metade heterozigotos (*Cc*). Verificou-se, com surpresa, que o gen *C* é completamente epistático sobre a condição heterozigota do gen *Sd*, dando, o F_1 , 50% de plantas *calycanthema* (*Sdsd Cc*) e 50% de plantas híbridas para goiaba (*Sdsd cc*). Prosseguindo a análise, obtivemos uma planta de constituição *sdsd Cc*, quer dizer, homozigota para o gen recessivo *sd* e heterozigota para *C*, e que também é tipicamente *calycanthema*. A epistase é, pois, completa, sendo suficiente uma dose do gen *C* para mascarar completamente o efeito de duas doses do gen *sd*.

3.2—BRONZE (*BrBr*) x PURPURASCENS (*prpr*)

Um característico de difícil análise é a coloração das folhas novas do cafeeiro. Estas, em se tratando da coloração bronze, condicionada pelo par de fatores *BrBr*, são verde-claras logo de início e adquirem cor bronzeada, pela maior exposição à luz. Essa coloração vai-se tornando cada vez mais

intensa, até atingir um máximo, para depois novamente desaparecer, à medida que a folha cresce.

O tipo bronze-escuro, *BrBr*, é dominante; o verde, *brbr*, recessivo; apresentando, o híbrido, coloração intermediária.

O genótipo *purpurascens* possui um par de gens recessivos *prpr*, que condiciona, nas suas folhas novas, uma coloração purpúrea, e na folhagem madura, uma coloração verde-violácea, bem característica.

Cruzando-se o tipo verde com o *purpurascens*, F_1 é verde e F_2 segrega em 3 verdes para 1 *purpurascens*. Cruzando-se, entretanto, o *purpurascens* com o tipo bronze (*BrBr*), obtém-se em F_1 um tipo bronze mais escuro do que este. Em F_2 foram encontrados indivíduos verdes, *purpurascens* típicos, *purpurascens* levemente bronzeados, bronze-claros, e uma classe numerosa de indivíduos bronze-escuros. Os indivíduos desta última classe diferem um pouco uns dos outros, quanto à intensidade de coloração, sem que seja possível subdividi-la com segurança. Deduz-se, desta análise, que os gens *bronze* e *purpurascens* não são alelos; que o *purpurascens* é duplamente recessivo; que a ação do par de gens *prpr*, *purpurascens*, é completamente inibida pelo par *brbr*, *verde*, e não é pelo *BrBr*, e que, finalmente, o tipo bronze, além de possuir o par *BrBr*, ainda encerra os alelos dominantes de *pr*.

Baseando-se neste fato, o esquema genético seria o seguinte:

BrBr PrPr (bronze) x *brbr prpr* (*purpurascens*)

$F_1 = Brbr Prpr$ (bronze-escuro)

Supõe-se que os genótipos encontrados em F_2 tenham a seguinte coloração:

1	<i>BrBr PrPr</i>	bronze-normal
2	<i>BrBr Prpr</i>	bronze-escuro
1	<i>BrBr prpr</i>	<i>purpurascens</i> -bronzeado
2	<i>Brbr PrPr</i>	bronze-claro-normal
4	<i>Brbr Prpr</i>	bronze-escuro
2	<i>Brbr prpr</i>	bronze-chocolate
1	<i>brbr PrPr</i>	verde
2	<i>brbr Prpr</i>	verde
1	<i>brbr prpr</i>	<i>purpurascens</i>

Trata-se, pois, de um caso típico de interação de fatores, resultando no aparecimento, em F_2 , de várias colorações novas, dentre elas o próprio verde.

3.3—LAURINA (*lrlr*) x MOKKA (*momo*)

As variedades *laurina* e *mokka* representam tipos de ramificação densa, de porte e folhas menores do que o café comum. A primeira possui ainda frutos e sementes pontudas em sua base e, o *mokka*, domácias muito grandes, e sementes e frutos muito pequenos. O *laurina* demonstrou ser devido a um único par de gens principais recessivos *lrlr*, segregando, o F_2 , normalmente, em 3 normais para 1 *laurina*. A hereditariedade do *mokka* é, entre-

tanto, um pouco mais complicada : o F_1 normal x mokka é constituído por um tipo mais ou menos intermediário de plantas, e no F_2 , além dos tipos esperados, normal, intermediários e mokka, encontram-se, com surpresa : 1) uma classe de plantas tipicamente laurina ; 2) outra de um laurina com certos indícios de mokka e 3) mais duas classes de plantas de crescimento inicial muito particular, tipo vareta, de frutos mokka, porém de ramificação e porte mais semelhantes aos de cafeeiros comuns.

O esquema genético proposto é o seguinte :

LrLr MoMo (normal) x *lrlr momo* (mokka)

F_1 : *Lrlr Momo* (intermediário)

F_2 : 1 *LrLr MoMo* normal
 2 *LrLr Momo* intermediário
 1 *LrLr momo* mokka de porte normal (vareta)
 2 *Lrlr MoMo* normal
 4 *Lrlr Momo* intermediário
 2 *Lrlr momo* mokka de porte normal (vareta)
 1 *lrlr MoMo* laurina
 2 *lrlr Momo* laurina com indícios de mokka
 1 *lrlr momo* mokka

O laurina "sintético", assim obtido, é homozigoto, dando em sua descendência só exemplares tipicamente laurina. Conclui-se, pois, que o mokka é condicionado por dois pares de gens, um recessivo (*lrlr*) e outro de dominância incompleta (*momo*).

3.4—TYPICA (*TT*) x NANA (*nana*)

As variedades mais cultivadas de *C. arabica* são, indiscutivelmente, *typica* (café nacional) e *bourbon*. Diferenciam-se por uma série de caracteres quantitativos e qualitativos, em geral difíceis de serem avaliados, tais como : dimensões e formas das folhas, tipo de ramificação, forma dos frutos e sementes e coloração das folhas novas. Sabe-se, pelas primeiras análises genéticas efetuadas, que a var. *bourbon* possui um par de gens dominantes *NaNa* e que as formas heterozigotas e homozigotas dêste gen constituem, respectivamente, as variedades *murta* e *nana*. O cruzamento *typica* x *bourbon* origina um tipo mais ou menos intermediário e um F_2 um tanto variável, cuja classificação em *typica*, *bourbon* e tipos intermediários é praticamente impossível, sugerindo, à primeira vista, a existência de fatores múltiplos. Para esclarecer a diferença genética entre estes dois genótipos, fizeram-se cruzamentos entre a var. *typica*, de um lado, e a var. *murta* e *nana* de outro. Apesar de não estar ainda completamente terminada, conclui-se, preliminarmente, que a var. *typica* possui um par de gens dominantes *TT* de ação epistática sobre *NaNa* e *Nana*. Analisando-se apenas os resultados dos híbridos *typica* x *nana*, foi possível organizar o seguinte esquema :

TT NaNa (typica) x *tt nana* (nana)

F₁: *Tt Nana* (normal, quase typica)

F₂: 1 *TT NaNa* typica

2 *TT Nana* normal

1 *TT nana* normal (?)

2 *Tt NaNa* normal

4 *Tt Nana* normal

2 *Tt nana* murta de folhas maiores

1 *tt NaNa* bourbon

2 *tt Nana* murta

1 *tt nana* anão

Como se vê, não nos foi dado separar, convenientemente, as cinco primeiras classes, destacando-se possivelmente, neste grupo, o genótipo *TT nana*, que possui folhas mais largas. De especial interesse neste cruzamento ainda se apresenta uma forma nova de *murta*, de folhas grandes, que, por hipótese, tem a constituição *Tt nana*. Tais plantas já foram autofecundadas e cruzadas com vários outros genótipos, sendo que as observações preliminares, no viveiro, parecem confirmar esta idéia.

3.5—FATORES *ANGUSTIFOLIA*

O aparecimento da variação *angustifolia* é relativamente frequente nos viveiros, caracterizando-se as plantas por apresentar folhas alongadas, de ângulo agudo na base e, às vezes, por serem multicaules e possuírem frutos e sementes um pouco mais alongados do que no café comum.

Até o presente já se conhecem, pelo menos, seis fatores independentes que causam, com apenas pequenas variações, o mesmo fenótipo *angustifolia*. Dois deles, recessivos, quando cruzados, fornecem F₁ normal, segregando, em F₂, na proporção de 9 normais para 7 *angustifolias*. Temos, pois, aqui, um exemplo de interação de fatores com mudança da relação mendeliana normal, mas sem o aparecimento de tipos novos.

O mais interessante é, entretanto, a verificação de que algumas das plantas caracteristicamente *angustifolia* segregam, quando autofecundadas, na proporção aproximada de 3 normais para 1 *angustifolia*. A análise genética vem sendo continuada, supondo-se a existência, nas plantas em questão, de fatores (*dominigens* de Goldschmidt?) que influem sobre o grau de dominância do alelo normal sobre o *angustifolia*. Interessante também foi a verificação de que o caráter *angustifolia*, às vezes, somente se manifesta em mudas novas (juvenis), desaparecendo à medida que a planta híbrida se desenvolve, adquirindo então folhas perfeitamente normais.

4—MUTAÇÕES SOMÁTICAS PROVOCANDO O APARECIMENTO DE QUIMERAS GENÉTICAS

Recentemente, tivemos o ensejo de publicar um trabalho no qual se relatou a ocorrência de algumas quimeras genéticas em café. Verificou-se que, num dos casos, uma planta murta (*Nana*) deu origem a um ramo tipicamente bourbon (*NaNa*), em virtude, sem dúvida, da mutação somática

de *na* — *Na*. Autofecundando-se as flores do galho mutado e estudando-se a sua progênie, verificou-se que os gâmetas formados neste galho eram 50% de constituição *Na* e 50% *na*. Demonstra isto que, provavelmente, a segunda camada geradora, que dá origem aos gâmetas, não foi atingida pela mutação. Disso se deduz que o referido galho é de natureza quimérica (quimera periclinal), tendo a mutação somática atingido somente outra ou as demais camadas geradoras, responsáveis pelo formato das folhas.

Em trabalho a ser apresentado, nesta reunião, pelo engenheiro agrônomo Dixier Marozzi Medina, será relatado um outro caso, provavelmente semelhante, que deu origem à var. *rugosa* de *C. arabica*.

5—MUTAÇÕES DE VALOR ECONÔMICO

Constituindo os trabalhos de melhoramento o setor mais importante dos estudos em realização na Secção de Genética do Instituto Agrônomo, finalizamos esta palestra com um rápido apanhado sobre as mutações de interesse econômico que têm ocorrido na espécie *C. arabica*. Pelo menos oito, das dezoito em exame, apresentam, por uma razão ou outra, interesse econômico, seja pela produtividade, precocidade, hábito de florescimento, rusticidade, ou, ainda, qualidade do produto. Vejamos como se originaram:

Levando-se em conta apenas estes oito mutantes, o tipo considerado primitivo — *C. arabica* var. *typica* — teria a seguinte constituição:

TT NaNa mgmg XcXc CeCe LrLr SfSf ctct MoMo

A partir deste tipo primitivo, originaram-se, por mutação, quatro tipos; destes, o *bourbon* deu origem a mais três e, finalmente, dentre estes, o *laurina* deu origem, por mutação, ao *mokka*:

TT → *tt* = *bourbon* — *LrLr* → *lr lr* = *laurina* — *MoMo* → *momo* = *mokka*.

„ → *SfSf* → *sfsf* = *semperflorens*.

„ — *ctct* → *CtCt* = *caturra*.

mgmg → *MgMg* = *maragogipe*.

XcXc → *xcxc* = *xanthocarpa*.

CeCe → *cece* = *cêra*.

Se o *mokka* fôr o tipo primitivo ou selvagem de *C. arabica*, ter-se-á, evidentemente, um esquema um pouco diferente.

Examinando-se ainda, rapidamente, os caracteres destes mutantes, tem-se:

a) O **bourbon**, como se sabe, caracteriza uma das variedades mais produtivas, que se diferencia da var. *typica* por uma série de fatores qualitativos e quantitativos. A ramificação é mais densa, as folhas com ângulo da base mais largo, as folhas novas de coloração verde-clara, e longevidade aparentemente menor.

b) O **maragogipe** representa a forma “gigas” do *C. arabica*. Trata-se de uma mutação dominante. O porte é maior que o da var. *typica*, bem como as folhas, flores, frutos e sementes. A produção, todavia, é mais

baixa. Várias linhagens dessa variedade estão sendo isoladas na Secção de Genética, caracterizadas pela produção bem mais elevada que a do maragogipe original.

c) O **xanthocarpa** ocorre em diversas variedades de café, porém a mutação primitiva parece ter-se dado na var. *typica*, originando o café Amarelo de Botucatu. Em combinação com o genótipo do bourbon, parece resultar num cafeeiro mais produtivo, que vem merecendo especial atenção nos estudos de melhoramento pela Secção de Genética e Secção de Café do Instituto Agrônômico.

d) O **cêra** é um mutante recessivo, que difere da var. *typica* apenas pela coloração cêra das sementes. O produto tem boa aceitação no mercado, se não fôr misturado com sementes verdes.

e) As pequenas partidas de café do mutante **laurina** têm alcançado cotações especiais pela sua excelente qualidade. Produz um café de sementes e frutos pontudos. Como o **mokka**, é um cafeeiro de porte pequeno e de ramificação densa.

f) O **semperflorens**, também uma mutação recessiva, deve ter-se originado a partir do bourbon, e dêle difere por apresentar florescimento contínuo, praticamente durante todo o ano. Sua produção total anual pouco difere da produção do bourbon e talvez ainda venha a ser cultivado em algumas zonas de clima especial e por pequenos sitiantes interessados no despolpamento de pequenas quantidades de café.

g) Das mutações encontradas, o **caturra** é uma das mais recentes. Ocorrida primeiramente no Estado de Minas Gerais, foi logo trazida para Campinas, onde começou a ser analisada. Por se tratar de uma mutação que afeta o porte da planta, tem-se encontrado bastante dificuldade nas classificações, tornando-se a análise genética dêsse característico uma das mais difíceis. Trata-se de uma mutação dominante, de grande interesse econômico, pois, além de apresentar porte reduzido, é de grande produtividade.

h) O **mokka** tem mostrado ser de interesse para se obterem, pela hibridação, novos tipos de café, produtivos, e de ramificação menos densa que o dessa variedade. A combinação com o maragogipe tem-se mostrado particularmente promissora.

6—CONCLUSÕES

Em conclusão, podemos afirmar que o cafeeiro, apesar de já ter sido classificado hoje como constituindo material “íngrato” para pesquisas genéticas, vem oferecendo excelente oportunidade para o estudo de mutações, as quais, como vimos, são de natureza as mais diversas — gênicas, cromosômicas e citoplasmicas — afetando numerosos caracteres da planta. Vêm estas e outras pesquisas fornecendo uma base científica sólida para os demais trabalhos sobre café, em andamento na Subdivisão de Genética, e contribuem, outrossim, para um conhecimento cada vez melhor do cafeeiro, o “homenageado” desta sessão da “Segunda Semana de Genética”.

AGENTES DE POLINIZAÇÃO DA FLOR DO CAFEEIRO (*COFFEA ARABICA* L.)⁽¹⁾

A. CARVALHO, engenheiro agrônomo da Subdivisão de Genética e C. A. Krug⁽²⁾, engenheiro agrônomo, Diretor do Instituto Agronômico de Campinas.]

1—INTRODUÇÃO

Quando se esboçou, em 1932, o programa geral dos trabalhos com café, na Seção de Genética, incluiu-se, como um dos itens básicos, o estudo da biologia da flor do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). O conhecimento dêste assunto é de suma importância, não somente para delinear os melhores métodos de polinização artificial, mas também para elucidar se esta espécie é autógama ou até que ponto é de fecundação cruzada. Da solução dêste último problema, também dependia a escolha dos processos mais adequados de melhoramento.

Relativamente, poucos dados se encontravam então na literatura sobre o assunto. Cramer (1) cita os trabalhos básicos de von Faber, que observou a ocorrência de autopolinização dentro dos botões ainda fechados de *Coffea liberica* Hiern. Nesta espécie, os insetos também efetuam a polinização estranha, sendo que o pólen de outras plantas germina mais rapidamente do que o pólen próprio. No café Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), Cramer verificou a ocorrência, principalmente, da polinização cruzada. Em seguida, êsse autor fez referência ao hábito de florescimento em *C. arabica*, nada adiantando, entretanto, sobre as modalidades de polinização.

Zimmermann (8) fez várias considerações sobre a biologia da flor do cafeeiro; chegou à conclusão de que as flores são caracteristicamente entomófilas, sendo muito procuradas por abelhas, vespas e môseas, principalmente quando se trata de pés isolados. Nas grandes culturas, no entanto, acha que o vento deve ser o principal agente de polinização, não ocorrendo os insetos em número bastante para efetuá-la convenientemente. Concluiu ainda, o mesmo autor, que a ocorrência das chuvas durante a florada é prejudicial, pois diminui a ação benéfica do vento, torna menos frequente a visita de insetos e pode fazer germinar o pólen dentro das próprias anteras.

Taschdjian (7), que trabalhou algum tempo no Instituto Agronômico, publicou as suas observações preliminares sobre o assunto, feitas em *C. arabica*, em 1932. Resumindo, concluiu: a) que não há autopolinização no botão ainda fechado; b) que há boa percentagem de frutificação, protegendo-se flores individuais com sacos de papel; c) que dos insetos que

(1) Trabalho apresentado à "Segunda Semana de Genética", realizada em fevereiro de 1949 na Esc. Sup. de Agric. "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, São Paulo.

(2) Os autores expressam os seus agradecimentos aos colegas Célio S. Novais Antunes e Hermindo Antunes Filho e a todos os auxiliares que prestaram o seu valioso concurso à execução do presente trabalho.

promovem a polinização, em Campinas, são mais frequentes as abelhas comuns e a *Melipona testaceicornis* Lep., e d) que o vento também contribui para a polinização. Usei, pela primeira vez em café, a técnica sugerida por N. Heribert-Nilsson (3) e que consiste no emprêgo de **indicadores genéticos** para determinar a intensidade do "Vicinizmus" (polinização estranha). Valendo-se do indicador recessivo *purpurascens*, Taschdjian obteve, nos canteiros de sementeira, de 39 a 93% de mudas **verdes**, procedentes de sementes híbridas, em virtude da polinização cruzada natural. Concluiu daí que, nas condições do ambiente de Campinas, o cafeeiro *arabica* é, essencialmente, **alógamo**, não chegando a verificar qual a contribuição do vento e dos insetos nesta polinização estranha.

Vários outros pesquisadores ainda se dedicaram a esse assunto, principalmente em Java, ocupando-se, entretanto, de preferência, com o café *Robusta* (*C. canephora*). Ferwerda, em recente artigo (2), nos dá conta destes trabalhos, concluindo que, para esta última espécie, em Java, o vento constituiu o principal agente de polinização. Expondo lâminas devidamente preparadas, verificou que é grande a quantidade de pólen que flutua no ar por ocasião das floradas, mesmo a 100 metros de distância do solo. Além do vento, apurou Ferwerda que também a gravidade exerce papel importante na polinização. Quanto à longevidade do pólen, verificou que, guardado em condições favoráveis, ainda germina até um mês após a deiscência das anteras.

Mesmo levando-se em conta os trabalhos de Taschdjian, poucas eram as informações sobre a biologia da flor de *C. arabica*, de que dispúnhamos no início dos nossos trabalhos. Assim sendo, realizamos, nos primeiros anos, em colaboração com o engenheiro agrônomo J. E. T. Mendes, Chefe da Seção de Café do Instituto Agrônômico, uma série de observações preliminares, das quais se deduziu o seguinte: a) os botões florais do cafeeiro (*C. arabica*) abrem-se logo pela manhã, achando-se nessa ocasião ainda fechadas as anteras; b) em dias secos, a deiscência destas ocorre logo a seguir; c) o pólen é leve, sendo produzido em quantidade regular; d) tanto a gravidade como o vento e os insetos agem na transferência do pólen das anteras para os estigmas; e) em dias úmidos e chuvosos, os botões demoram para abrir, tendo-se então verificado a existência de pólen dentro dos botões ainda fechados, podendo dar-se a autopolinização; f) a ocorrência de chuvas durante as floradas parece prejudicar muito pouco a polinização, talvez aumentando a percentagem de autopolinização, e g) usando-se o mesmo indicador genético utilizado por Taschdjian, a var. *purpurascens*, apurou-se, na sementeira, a existência de cerca de 40 a 50% de mudas **verdes**, procedentes da **hibridação estranha natural**.

Os resultados obtidos nestas observações preliminares serviram de base para a escolha dos melhores métodos de castração e polinização artificial (4). Em consequência das observações de Taschdjian, que julgávamos confirmadas por novos dados, também obtidos com o indicador genético *purpurascens*, concluiu-se que, aparentemente, a percentagem de fecundação cruzada, nesta espécie de café, oscilava em torno de 50% (5, 6).

Não satisfazendo, entretanto, os dados até então conseguidos, resolveu-se, em 1945, esboçar um novo plano bem mais minucioso, a fim de estudar, pormenorizadamente, o mecanismo da transmissão do pólen nas flores de *C. arabica*. Este foi pôsto em execução durante os últimos anos (1945 a 1947), na Estação Experimental Central do Instituto Agrônômico, em Campinas (Alt. 687 metros; lat. 22°5'18"; long. 47°04'22"). O novo plano de estudos visou esclarecer, com a maior exatidão possível: a) qual a contribuição à fecundação, da autopolinização própria, isto é, da autopolinização natural dentro da mesma flor, sem o concurso do vento, dos insetos e da gravidade; b) qual a contribuição, separadamente ou em conjunto (dois a dois e todos os três), destes agentes — vento, insetos e gravidade — tanto na autopolinização, como na polinização estranha.

Por vários motivos, nem todos os itens do programa estabelecido puderam ser efetuados, tais como: determinação da distância, horizontal e vertical, a que o pólen do café pode ser transportado pelo vento e pelos insetos; longevidade do pólen; duração da receptividade do estigma; classificação dos insetos que visitam as flores, além de alguns outros problemas. Notou-se que a determinação do papel de um dado agente na polinização, quer isolado quer em conjunto com outros, é, muitas vezes, bem difícil e sujeita a enganos. Lançou-se mão de muitos artifícios, a fim de serem obtidos resultados os mais acurados possível. Surgiram, porém, dificuldades que, às vezes, não puderam ser superadas e, assim, os resultados que foram obtidos são apenas os mais aproximados possível.

Os dados adiante apresentados contribuem, no entanto, para esclarecer o mecanismo geral da polinização nas flores do cafeeiro.

2—MATERIAL E MÉTODO

Em pesquisas anteriores, efetuadas no Instituto Agrônômico, sobre o modo de transmissão do pólen, como já se mencionou, usou-se, como indicador genético, o característico recessivo *purpurascens*. Plantas purpurascens, localizadas no meio de plantas normais no cafézal, foram selecionadas e seus frutos colhidos e semeados, determinando-se, em sua progênie, o número de plantas híbridas resultantes de cruzamentos naturais. Acontece, porém, que as plantas purpurascens são, aparentemente, mais fracas que as híbridas e a germinação de suas sementes menos satisfatória, o que pode prejudicar as relações finais. Daí os resultados um tanto elevados, obtidos por Tashdjian e pelos autores deste trabalho.

Os dados mais adiante apresentados foram obtidos, em sua grande maioria, com o auxílio do indicador genético *cêra*. Trata-se de um fator que determina a coloração amarela do endosperma e que é recessivo em relação à cor verde normal. As próprias sementes resultantes do cruzamento de *cêra* com *verde* já são *verdes* (xênia), o que vem facilitar as determinações da intensidade de polinização estranha.

Na escolha dos cafeeiros *cêra*, no cafézal, deu-se preferência a plantas rodeadas de cafeeiros normais. Quando o cafeeiro *cêra* escolhido se localizava ao lado de outra planta *cêra*, as flores deste último cafeeiro eram todas eliminadas para impedir as contaminações.

Sòmente em raras ocasiões, as variedades *bourbon* e *typica* foram usadas, e isto quando não se tornou necessária a determinação da intensidade da polinização estranha.

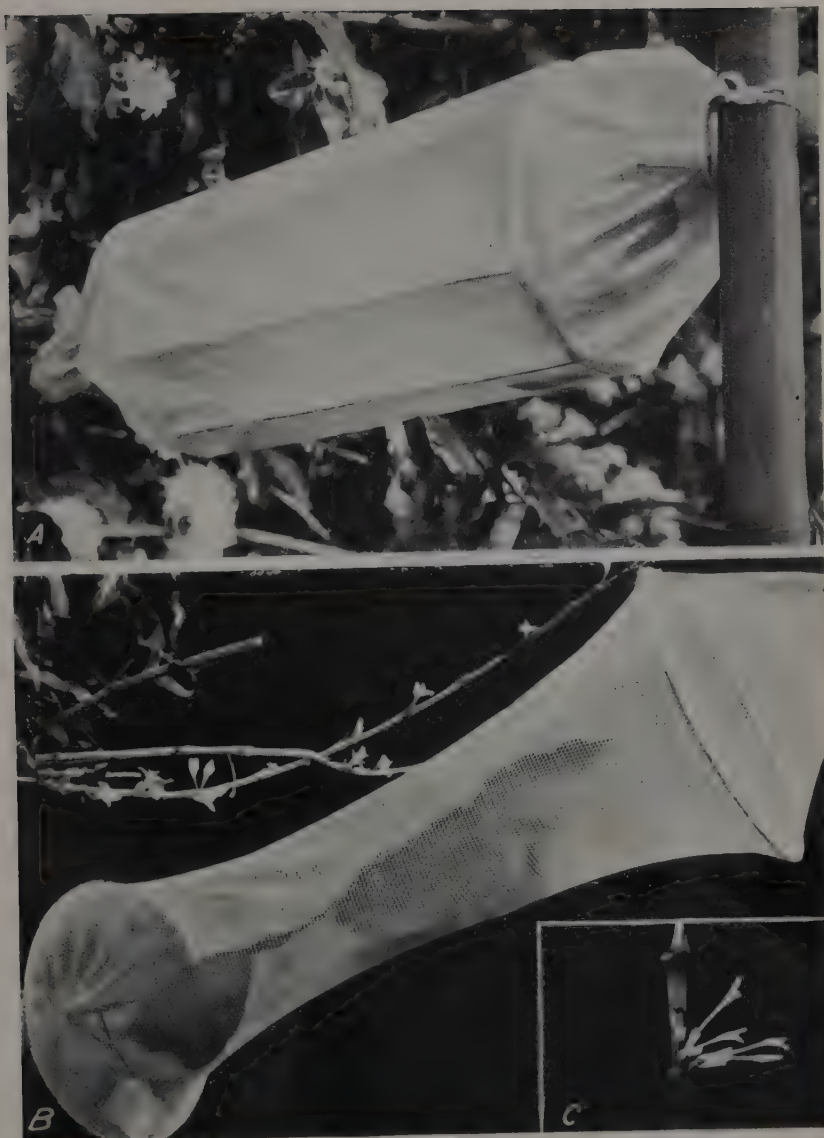
Sempre que foi preciso o afastamento das plantas do cafézal, usaram-se cafeeiros plantados em barreira de madeira. Êstes foram transportados para diferentes localizações, a fim de se poder estudar, separadamente, o efeito dos vários agentes da polinização. Em alguns casos, tôdas as flores foram retiradas, deixando-se apenas aquelas correspondentes ao item em estudo.

Para a determinação da autopolinização própria, isto é, da polinização sem o auxílio do vento, dos insetos e da gravidade, usou-se uma armação especial de arame, recoberta por uma camada dupla de papel impermeável (est. 1-A). Ramos com um só botão floral por nó, ou com vários botões por nó, foram envolvidos por essas armações. As extremidades dessas armações e a base dos ramos foram amarradas em estacas de bambu, para impedir a movimentação dos ramos no seu interior. Na extremidade da armação presa à base do ramo do cafeeiro, usou-se algodão, para impedir a entrada de formigas. Não foi possível, entretanto, eliminar o efeito de Thrips, que, às vêzes, são encontrados mesmo no interior dos botões, ainda não abertos. Dêste modo, no item **autopolinização própria**, fica incluído o efeito de Thrips e de alguns outros insetos pequenos.

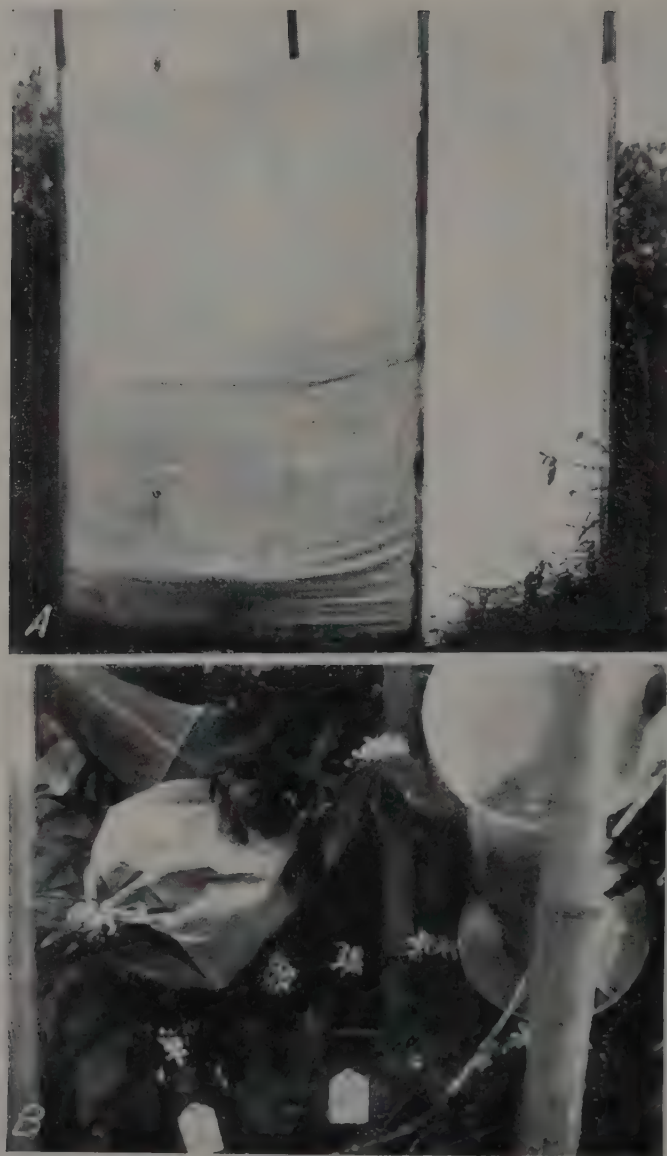
Na determinação do efeito máximo do vento na autopolinização, usaram-se cafeeiros da var. *typica* em barreira de madeira. Êstes foram transportados para a sede do Instituto Agrônômico, onde não havia outros cafeeiros, e colocados no interior de uma estufa lateralmente protegida com tela de arame bem fino. O cafeeiro foi disposto de modo que ficasse com os ramos contendo flores normais voltados para o lado da entrada do vento predominante e com os ramos castrados e envoltos em armação de filó (est. 1-B) do lado oposto. A castração aqui usada foi do tipo comumente empregado nos cruzamentos artificiais (4) e que consiste na remoção completa do tubo da corola com as anteras, um a dois dias antes da abertura da flor (est. 1-C). A armação de arame com filó foi utilizada, por precaução, contra a entrada de algum inseto na estufa, e tôdas as flores localizadas acima dos ramos castrados foram eliminadas.

Para se estudar o efeito máximo do vento na polinização estranha, também não se tornou necessário usar a variedade *cêra*. Em plantas da var. *bourbon*, localizadas no meio do cafézal, escolheram-se vários ramos ponteiros, cujas flores foram castradas e envoltas em armação de filó. Tôdas as demais flores da planta foram eliminadas. A castração adotada foi do tipo comum, já descrito. Na ausência de flores na própria planta, tôdas as sementes aí produzidas constituem o resultado da polinização pelo vento.

Ao se determinar o efeito do vento na polinização estranha, mas em flores normais, lançou-se mão de ramos ponteiros de plantas *cêra*, localizadas no cafézal, cujas flores, não castradas, foram apenas protegidas com armação de filó. As sementes **verdes** produzidas nessas condições foram consideradas como resultantes da polinização estranha pelo vento, em flores normais.



Sistemas de controle da polinização. A — Armação recoberta com dupla camada de papel impermeável, usada para obter o item **autopolinização própria**. B — Armação de filô protegendo flores castradas. C — Flores castradas.



Contrôles da polinização. A — Proteção lateral de pano oleado para isolamento contra o vento. B — Ramos inferiores com flores castradas para o estudo do efeito máximo do vento, insetos e gravidade na autopolinização e polinização estranha.

Um novo tipo de castração das flores foi usado ao se determinar o efeito máximo dos insetos na autopolinização e na polinização estranha, isto é, castração sem eliminar a corola. Cerca de dois dias antes da abertura dos botões, os lobos da corola são parcialmente afastados, e as anteras retiradas com o auxílio de uma pinça de ponta bem afilada. A seguir, o botão é novamente fechado. A cêra que normalmente cobre, em leve camada, as pétalas do botão, permite que o mesmo se mantenha fechado até o momento de sua abertura normal. Para a determinação do efeito máximo dos insetos na polinização estranha, usaram-se vários métodos, um dos quais consistiu no emprêgo de ramos ponteiros de cafeeiros cêra, no cafèzal, protegidos contra o vento por uma armação lateral de pano espêss e pintado a óleo (est. 2-A), tendo-se efetuado a castração especial de flores. As sementes **verdes** colhidas dessas flores são o resultado de cruzamentos pelos insetos, e as sementes **cêra** representam a contribuição máxima dos insetos na autopolinização, dentro da planta. Também para se determinar o efeito máximo dos insetos na polinização estranha, usou-se cafeeiro plantado em barrica, que foi transportado para local distante do cafèzal, mas ao alcance dos insetos. As flores de alguns ramos foram castradas, sem eliminação da corola, e as demais flores da mesma planta, eliminadas. Tôdas as sementes aí produzidas resultam de cruzamentos pelos insetos.

Para estudar o efeito máximo da gravidade na autopolinização, o cafeeiro foi levado para uma sala fechada, ficando assim protegido contra insetos e vento. Flores de ramos inferiores foram simplesmente castradas, deixando-se as demais flores normais na parte superior da planta.

A fim de se verificar o efeito máximo e conjunto do vento mais insetos e mais gravidade na autopolinização, usaram-se cafeeiros cêra, no cafèzal, cujos ramos inferiores foram castrados e conservados sem nenhuma proteção (est. 2-B). As sementes **cêra** colhidas dão a percentagem total de autopolinização por êsses três agentes, e, as sementes **verdes**, o efeito dêsses mesmos agentes na polinização estranha.

Os demais efeitos conjuntos dos diferentes agentes de polinização foram obtidos por combinação dessas diferentes técnicas adotadas (est. 3-A).

Sempre que possível, vários itens foram efetuados no mesmo cafeeiro, para facilitar a colheita das sementes. Cada ramo foi devidamente numerado e etiquetado, anotando-se, em fichas especiais, além do número do cafeeiro, a variedade e a sua localização, o número do galho, o item correspondente e o número de flores. Dois a três meses após o florescimento, fêz-se uma contagem preliminar do número de frutos verdes para verificar a frutificação.

Várias colheitas foram feitas para cada ramo, retirando-se, de cada vez, somente os frutos bem maduros. O número de frutos por colheita, bem como as datas dessas colheitas foram registradas na mesma ficha. Os frutos foram despulpados à mão, para que não se perdesse nenhuma das sementes. As sementes foram secas em pequenos sacos de tela de pano e, a seguir, tirou-se, cuidadosamente, o pergaminho de cada uma delas, anotando-se, por esta ocasião, o número de sementes **chochas**. Para melhor

classificação de sementes em **cêra** e **verde**, usou-se limpar as sementes com algodão umedecido em água, removendo completamente a película prateada, a qual, quando muito aderente, impede a classificação das sementes.

As sementes foram divididas em tipos, cada um dêles subdividido, conforme especificado no quadro 1, tendo-se anotado sempre a presença de sementes **chochas**.

QUADRO 1.—Classificação dos tipos de sementes de acôrdo com a coloração.

Tipos de sementes	Coloração
Chato	cêra ; verde ;
Moca	cêra ; verde ;
Concha	2 cêra ; 2 verde ; 1 cêra e 1 verde
De frutos com três lojas	3 cêra ; 3 verde ; 1 cêra e 2 verde ; 2 cêra e 1 verde ; 1 verde e 2 cêra ; 2 verde e 1 cêra.

As variedades usadas possuem frutos com duas lojas, contendo cada uma delas, normalmente, um só óvulo. Quando os dois óvulos se desenvolvem, dão origem a um fruto com duas sementes do tipo **chato**. Quando um óvulo apenas se desenvolve, ficando a outra loja do fruto completamente atrofiada, o fruto apresenta uma única semente do tipo **moca**. Quando as lojas dos frutos se desenvolvem normalmente, encerrando apenas vestígios de sementes, estas são classificadas como do tipo **chocha**. Finalmente, quando dois ou mais óvulos se desenvolvem, conjuntamente, na mesma loja de um fruto, as sementes anormais resultantes são do tipo **concha**. Há alguns frutos que, possuindo três lojas normais, dão origem a três sementes, que são reconhecíveis pelo seu formato.

Alguns casos de concha com três sementes foram anotados separadamente, bem como quando essas sementes concha eram as constituintes de uma semente do tipo **moca**. No geral, foi fácil a separação dos grupos de sementes em **cêra** e **verde**. Sômente em poucas plantas, a separação não se mostrou bem nítida. Provavelmente, neste último caso, a planta cêra usada possui alguns modificadores, que alteram para mais esverdeada a cor das sementes.

Os dados obtidos foram reunidos primeiramente por cafeeiro e depois por item, em anos separados. Juntaram-se, a seguir, os mesmos itens obtidos em anos diferentes, achando-se, para cada um dêles, o número total de flores, o número de frutos, o número total de sementes, e o de sementes **cêra** e **verde**. Resolveu-se expressar o número de sementes produzidas em função do número inicial de óvulos das flores, o que será exemplificado mais adiante.

Sempre que se tornou possível, estabeleceram-se ramos contrôles para os cafeeiros onde foram efetuados diversos itens. Esses contrôles consistem em ramos com flores normais e localizadas em vários pontos da planta e nos quais apenas se anotou o número de botões florais (est. 3-B). Os dados colhidos dessas testemunhas foram do mesmo modo registados em fichas,



Contrôles da polinização. A — Armação de filô, protegendo as flores contra a polinização pelos insetos. B — Contrôlo geral.

e as sementes classificadas como para um outro item qualquer. Para controle dos ramos castrados, utilizaram-se flores emasculadas que foram artificialmente cruzadas, usando-se abundante quantidade de pólen.

3—RESULTADOS OBTIDOS

O plano geral de estudos dos agentes da polinização se acha especificado nos quadros 2 e 3. Aí se apresentam, além da descrição minuciosa dos vários itens, as variedades usadas, a localização dos cafeeiros, a posição dos ramos, o tipo de tratamento das flores, o tipo de proteção, algumas outras observações particulares referentes aos itens, a percentagem de fecundação total, expressa em termos de sementes **cêra** e **verde**, bem como as percentagens de sementes **verde** colhidas.

QUADRO 2. —Relação e classificação dos itens referentes aos agentes da polinização estudados

Efeito dos agentes da polinização nos cafeeiros	Agentes da polinização	Número de itens
Máximo, na autopolinização na planta—(flores castradas).	Gravidade	8
	Vento	9
	Inseto	10
	Vento + gravidade	11
	Inseto + gravidade	12
	Vento + inseto	13 e 25
	Vento + inseto + gravidade	14
Máximo, na polinização estranha (flores castradas).	Vento	22
	Inseto	23
	Vento + inseto	24
Na polinização em geral, na planta (flores normais, sem castração).	Vento	1
	Vento + gravidade	3
	Vento + inseto	5
	Vento + inseto + gravidade	6
Na autopolinização na planta (flores normais, sem castração).	Autof. própria	7
	Autof. própria + vento	16
	Autof. própria + gravidade	15 e Contrôle 15 e 8
	Autof. própria + vento + inseto ...	20
	Autof. própria + vento + gravidade	18 e Contrôle 9
	Autof. própria + inseto + gravidade	19
	Autof. própria + vento + inseto + gravidade	21
Na autopolinização e na polinização estranha na planta (flores normais, sem castração).	Autof. própria + vento + inseto na autopol. + inseto na pol. estranha ..	2 e 17
	Autof. própria + inseto + gravidade na autopol. + inseto na pol. estranha	Contrôle 19, 10 e 12
	Autof. própria + vento + inseto + gravidade na autopol. + inseto na polinização estranha	4 e Contrôle 25
	Autof. própria + vento + inseto + gravidade na autopol. + vento + inseto + gravidade na pol. estranha	Contrôle geral e Contrôle 7

QUADRO 3.—Descrição dos itens e resultados obtidos

Item Número	Variedade	Localização	Posição do ramo	Flor ⁽¹⁾	Proteção	Percent. de fecundação			Percentagem do semente verde colhida	Observações ⁽²⁾
						Total	Sementes			
							cara	verde		
1	cara	Cafésal	Ponteiro	Normal	Tela de filó	41,9	36,9	5,0	11,7
2	"	Isolado	"	"	"	56,3	34,4	21,9	38,8	(b)
3	"	Cafésal	Inferior	"	Tela de filó	48,8	42,1	6,7	13,7
4	"	Isolado	"	"	Nenhuma	48,9	47,0	1,9	3,3	(c)
5	"	Cafésal	Ponteiro	"	"	55,4	50,9	4,5	8,1
6	"	"	Inferior	"	"	46,9	42,6	4,3	9,0	(d)
7	cara e typica	"	Média	"	"	24,1	(e)
8	typica	Isolado	Inferior	Castrada	"	33,6	(f)
9	"	"	Ponteiro	"	"	5,8	(g)
10	cara	Cafésal	"	Cast. esp.	"	37,7	22,6	15,2	40,2
11	"	"	Inferior	Castrada	Tela de filó	26,8	11,4	15,4	57,6
12	"	"	"	"	"	30,5	22,7	7,8	25,4
13	"	"	Ponteiro	"	Nenhuma	21,5	13,8	7,7	35,7	(g)
14	"	"	Inferior	"	"	35,4	25,2	10,2	28,6
15	typica	Isolado	"	Normal	"	61,4	(e)
16	cara	Cafésal	Ponteiro	"	Tela de filó	39,6	37,7	1,9	4,9
17	"	Isolado	"	"	"	51,8	51,8	0,0	0,0
18	"	Cafésal	Inferior	"	Tela de filó	44,1	37,7	6,4	14,6	(c)
19	"	"	"	"	"	48,9	45,3	3,6	7,4
20	"	"	Ponteiro	"	Nenhuma	55,6	51,8	3,8	6,8	(g)
21	"	"	Inferior	"	"	56,7	52,6	4,1	7,3
22	bourbon	"	Ponteiro	Castrada	Tela de filó	29,0	(a)
23	"	Isolado	Variável	Cast. esp.	"	16,7	(b)
24	bourbon e typica	Cafésal	"	"	Nenhuma	56,5	(a)
25	cara	Isolado	Ponteiro	"	"	40,2	40,2	0,0	0,0	(c)
Controle geral	"	Cafésal	Variável	Normal	Nenhuma	62,0	56,8	5,2	8,5
"	cara e typica	"	"	"	"	59,0	(e)
"	typica	Isolado	"	"	"	76,3	(f)
"	"	"	"	"	"	46,5	(g)
10, 12 e 19	cara	Cafésal	"	"	"	52,2	50,4	1,8	3,6	(g)
"	"	Isolado	"	"	"	61,2	61,2	0,0	0,0	(c)
25	"	Cafésal	"	Castrada	"	47,5	(b)
Controle castração	"	"	"	"	"

(1) Normal = flores normais; sem castração; castrada = flores castradas, com eliminação da corola; castração especial = flores castradas sem remoção da corola.
 (2) a' = eliminadas as demais flores da planta; b) = eliminadas as demais flores da planta e caféiro levado para longe do cafézal, mas ao alcance dos insetos; c) = todas as demais flores foram deixadas na planta; caféiro longe do cafézal, mas ao alcance dos insetos; d) = ramos isolados por armação especial de arame, rodeada por uma camada dupla de papel impermeável; e) = planta isolada em uma sala fechada; f) = planta isolada em casa de vegetação rodeada de tela de arame e longe do cafézal; flores deixadas do lado do vento e no resto da planta, com exceção daquelas acima das castradas; g) = planta rodeada com armação de pano espesso e pintada a óleo, no cafézal; h) = cruzamento artificial servindo de controle para as flores emasculadas.

Cada um dos resultados expressos no quadro 3 representa a média de dados obtidos em vários cafeeiros, num período de três anos consecutivos (1945 a 1947).

A **percentagem de fecundação** adotada representa a percentagem média de dados obtidos em relação ao número inicial de óvulos. O número inicial de óvulos é calculado multiplicando por dois o número de flores e acrescentando a esse total um número igual ao de frutos com três lojas e mais a metade do número de sementes do tipo **concha**. Os frutos com três lojas encerram três óvulos, e as sementes concha, no geral, correspondem a dois óvulos por loja. Assim, no item **contrôle geral** (quadro 3) foram contadas 1228 flores que produziram um total de 1603 sementes, sendo 59 chochas e 1544 sementes normais; destas, 1413 eram do tipo cêra e 131 verde, classificadas no quadro 4.

QUADRO 4.—Número de sementes de café de diferentes tipos e coloração obtidas de 1228 flores, constantes do item **contrôle geral** do quadro 3

Tipo de sementes	Número de sementes encontradas				Total
	cêra	verde	1 cêra + 1 verde	chocha	
Chato	1213	99	47	1359
Moca	140	20	8	168
Concha	49	10	4 (1)	4	67
De frutos com três lojas ...	9	9
Total	1411	129	4	59	1603

(1) Em duas lojas se encontrou uma semente **concha-cêra**, ao lado de outra **concha-verde**, num total de 4 sementes (2 cêra e 2 verde).

O número inicial de óvulos foi assim calculado :

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Número de flores} \times 2 & \dots\dots\dots & = 2456 \\
 \text{Número de frutos de 3 lojas} & \dots\dots\dots & = 3 \\
 \text{Metade do número total de sementes concha} & = & 31 \\
 & & \hline
 & & 2490
 \end{array}$$

A percentagem total de sementes, expressa em função de número de óvulos, é de 62,0%, e, a de sementes cêra e verde, de 56,8 e 5,2%, respectivamente.

Tornou-se necessário usar a percentagem de sementes em função do número inicial de óvulos, em vez da percentagem de frutificação, para dar

melhor idéia do número de sementes produzidas. Se se adotasse a percentagem de frutificação, os itens que dessem alta proporção de frutos moça ou de sementes chocha ficariam com valor exagerado.

Além disso, o cálculo da percentagem de fertilização, no contróle acima indicado, vem mostrar a capacidade total dos óvulos, no cafeeiro, de se transformarem em sementes.

Calculou-se, também, a percentagem de sementes **verde** colhidas, isto é, a percentagem de sementes **verde** em relação ao número total de sementes, que, no exemplo citado, é de 8,5%.

Nos quadros 2 e 3 podem-se, ainda, observar, alguns itens como 1 e 16, 5 e 20, 3 e 18 e 6 e 21, que, embora a princípio realizados em cafeeiros independentes e com finalidades diferentes, se tornaram perfeitamente comparáveis pelo fato de se terem empregado cafeeiros de variedade *cêra*. Isso somente foi notado por ocasião da reunião geral dos dados. Assim, no item 3, procurou-se determinar o efeito do vento mais o da gravidade na polinização em geral, item êsse que inclui a autopolinização própria e mais os efeitos da gravidade e do vento na autopolinização e os efeitos da gravidade e vento na polinização estranha. Para determinação dêsse item, realmente não havia necessidade de usar o *cêra*. Usando essa variedade, porém, a percentagem de fecundação, que foi de 48,8%, pôde ser decomposta em 42,1% para sementes **cêra** e 6,7% para sementes **verde**. A percentagem de sementes **verde** em relação ao total de sementes foi de 13,7%. O item 18 corresponde ao estudo da autopolinização própria e mais os efeitos da gravidade e do vento como agentes da autopolinização. Usando-se plantas *cêra* foi possível separar as sementes **cêra** que representam êsse item. A percentagem total de fecundação, neste caso, foi de 44,1%, que se compôs em 37,7%, para as sementes **cêra**, e 6,4 para as sementes **verde**. Neste caso, a percentagem de sementes **verde**, em relação ao total, foi de 14,6%.

Como se vê, êsses dois conjuntos de dados, obtidos em cafeeiros independentes e durante um período de três anos, se tornaram perfeitamente comparáveis e se mostraram bem concordantes.

Os dados obtidos nos contrôles serviram também para confirmar alguns dos resultados encontrados em vários itens.

Com os dados do quadro 3, organizou-se uma relação geral do efeito máximo de cada um dos agentes de polinização, isto é, do vento, dos insetos e da gravidade, tanto na autopolinização como na polinização cruzada e tanto separadamente como em conjunto. Determinou-se também o efeito dêsses mesmos agentes em flores normais, isto é, não castradas. Todos os resultados diretos obtidos foram comparados com resultados calculados por diferença entre as percentagens de fecundação de diferentes itens, encontrando-se, quase sempre, resultados concordantes. O efeito direto dos agentes, em alguns casos, não pôde ser obtido, usando-se, para representá-lo, os resultados calculados por diferença.

No quadro 5, são apresentados alguns dêsses resultados, reunidos em dois grupos principais, isto é, indicando a capacidade máxima dos agentes da polinização (flores castradas) e o efeito natural dêsses agentes em flores normais. A ação conjunta total dos agentes é igualmente especificada.

QUADRO 5— Efeitos dos agentes de polinização sobre as percentagens de fecundação, em flores castradas e em flores normais do cafeeiro

Agentes de polinização	Percentagem de fecundação			
	Efeito máximo dos agentes (flores castradas)		Efeito natural dos agentes (flores normais)	
	Na autopolinização	Na polinização estranha	Na autopolinização	Na polinização estranha
Vento	% 5,8 (*)	% 29,0	% 6,4 a 13,6	% 1,9 a 5,0
Insetos	22,6 (*§)	15,2 a 18,7 (§)	6,1 a 21,9	1,9
Gravidade	33,6	2,5 a 9,6	0,0 a 18,9	0,3 a 4,8
Vento + Insetos + Gravidade	25,2	10,2	18,5 a 32,7	4,1 a 5,2

(*) significa polinização dentro da planta.

(§) significa castração sem eliminar a corola.

Com exceção de um só caso, notou-se que as percentagens de fecundação correspondentes à polinização estranha são inferiores às percentagens na autofecundação, isso não só quando se considera a capacidade máxima dos agentes da polinização, como quando se determina o efeito natural desses agentes em flores normais.

Para se achar a capacidade máxima dos agentes da polinização, tornou-se necessário submeter o cafeeiro a condições bastante artificiais de meio. Por esse motivo, foram considerados de maior importância prática os resultados colhidos sobre o efeito dos agentes da polinização em flores normais, embora alguns deles só pudessem ser obtidos por diferença entre valores de dois outros itens.

Entre esses agentes se nota que o vento e os insetos têm, aproximadamente, o mesmo efeito (6,1 a 21,9%) na autopolinização, sendo menor e mais variável o efeito da gravidade. Quanto à polinização estranha, os dados indicam que o vento parece ser o agente principal.

O efeito conjunto dos três agentes variou, nas flores normais, de 18,5 a 32,7% na autopolinização e de 4,1 a 5,2% na polinização estranha.

A percentagem de sementes resultantes da polinização estranha, procedentes de flores normais no cafézal, oscilou entre 7,3 a 9,0%. Este dado é de bastante interesse, pois vem indicar que no cafeeiro arábica é bem reduzida a percentagem de polinização estranha. Essas percentagens

são bem mais baixas que as dadas por Taschdjian (7), Krug (5) e Krug e Costa (6), que obtiveram um valor aproximado de 50% de polinização estranha usando o indicador genético *purpurascens*. Como já se mencionou, podem ser apontadas como as possíveis causas dessa alta percentagem de fecundação obtida com a variedade *purpurascens*, a mais baixa percentagem de germinação das sementes comparada com a das plantas verdes híbridas, ou uma provável diferença na biologia da flor do *purpurascens*, quando comparada com a do cêra. Esta variedade se aproxima muito da var. *typica*, ao passo que a var. *purpurascens* difere da var. *typica* principalmente na coloração geral da planta, inclusive dos órgãos florais, sendo também menor o número de flores.

Em vista dos atuais resultados obtidos, as experiências com a var. *purpurascens* deverão ser de novo repetidas.

Considerando o cafeeiro como planta praticamente autógama, não seria de se esperar acentuado vigor híbrido nos cruzamentos dentro da espécie *arabica*. Os resultados até agora obtidos pela Secção de Genética parecem indicar que isto é realmente o que acontece.

De uma maneira geral, observou-se que os dados colhidos sofrem grandes oscilações, em virtude dos fatores do meio ambiente. Isso, aliás, era de se prever. Se o vento fôr mais intenso durante o florescimento, êle mostrará um efeito mais acentuado. Se, ao contrário, fôr menos intenso, os insetos poderão passar a desempenhar um papel mais relevante. Com chuvas durante o florescimento, tanto a ação do vento como a dos insetos deverão ser diminuídas. As variações das condições atmosféricas devem determinar, pois, acentuada variação nos dados colhidos, numa mesma planta, com o mesmo item, em vários anos, como foi amplamente verificado, tornando tarefa difícil a apresentação dos dados obtidos.

4—RESUMO E CONCLUSÕES

Após esclarecer a importância dos estudos em questão e apresentar um resumo bibliográfico, os autores relatam as diferentes técnicas de isolamento dos cafeeiros e de castração das flores, a fim de se poder estudar, separadamente e em conjunto, os efeitos máximos, em flores castradas, e os efeitos naturais, em flores normais, dos agentes da polinização. São apresentados e discutidos, a seguir, os resultados obtidos nas observações realizadas, durante três anos, na Estação Experimental Central do Instituto Agrônômico de Campinas, sobre mecanismo de transmissão do pólen em flores de *C. arabica*.

Foi estudado o efeito da autopolinização própria (dentro da mesma flor), bem como do vento, dos insetos e da gravidade, sôzinhos ou em conjunto, tanto na autopolinização como na polinização estranha. Observou-se que a influência desses agentes da polinização está sujeita a grandes oscilações, em virtude de numerosos fatores do ambiente; apesar disso, os dados obtidos são bastante significativos e de grande interesse.

Tomando por base o número total de óvulos de 1228 flores normais, verificou-se que apenas 62% dão origem a sementes. Este valor representa

a percentagem geral de fecundação, que deve ocorrer em condições naturais. Verificou-se que a autofecundação própria, isto é, a autofecundação sem o auxílio do vento, insetos e gravidade, promove, em média, 24% de fecundação (dentro das flores). Medindo-se o efeito combinado do vento, insetos e gravidade, achou-se que 18,5 a 32,5% de fecundação são devidos à autopolinização e, 4,1 a 5,2%, à polinização cruzada. A análise dos dados também mostra que, com exceção de um só caso, as percentagens de fecundação são sempre mais elevadas quando estas são promovidas pela autopolinização. Estes resultados ressaltam a importância dos efeitos da autopolinização em *C. arabica*.

Os dados colhidos em flores castradas se mostraram particularmente úteis na determinação dos efeitos máximos de cada um dos agentes da polinização, estudados sob condições especiais de isolamento.

A análise geral de todos os dados indica que, nas flores normais, a influência do vento e dos insetos em promover a autopolinização é praticamente igual, sendo menor e mais variável o efeito da gravidade. Quanto aos fatores que afetam a polinização estranha, o vento parece constituir o agente principal.

Baseando-se em diversas amostras de números elevados de sementes, obtidas de flores normais, achou-se que a percentagem de sementes resultantes da polinização estranha, no cafézal, oscila entre 7,3 a 9,0%. Estas percentagens são comparáveis às já mencionadas, de 4,1 a 5,2%; enquanto estes valores foram calculados a partir do número total de óvulos, os valores 7,3 a 9,0% foram obtidos, independentemente, a partir das sementes colhidas. Estes dados novamente mostram a limitada ocorrência da fertilização cruzada em *C. arabica*.

SUMMARY

This paper describes the methods used and presents an analysis of the results obtained from three years of study, to determine the separate and inter-related effects of various agents such as gravity, wind and insects, in the pollination of flowers of *Coffea arabica* L.

Observations were made and data obtained from several thousands of normal and castrated flowers that were maintained under natural and controlled conditions. It has been found that the importance of gravity, wind, and insects in pollination of the flowers may vary appreciably in relation to local environmental influences. The data obtained, however, indicate certain trends that are of definitive interest.

Based on the total number of ovules, it was found that in 1228 normal flowers observed, 62 percent produced seed. This value is believed to represent in general the percentage of fertilization that might be expected to occur naturally. In tests designed to exclude the influence of wind, insects, and gravity, it was found that an average of 24 percent fertilization (within flowers) occurred. In measuring the effects of the combined agents of wind, insects and gravity it was found that 18.5 — 32.7 percent fertilization occurred as a result of self-pollination and 4.1 to 5.2 percent was due to cross-pollination. Analysis of the data also show in all except one case, the percentage of fertilization resulting from self-pollination was higher than that from cross-pollination. These findings show the importance of self-pollination in *Coffea arabica*.

The use of castrated flowers was particularly helpful in determining the maximum effect of each of the pollinating agents studied under isolated controlled conditions.

The general analysis of all data indicates that in the case of self-pollinated normal flowers the influence of wind and insects are about equal and that the effect of gravity is relatively less and likely to be of variable importance. In the case of factors affecting cross-pollination of normal flowers, wind seemed to have the most important influence.

Based on a study of several different samples with large numbers of seed harvested from normal flowers, it was also found that the percentage of seed resulting from cross-pollination was 7.3 — 9.0%. This percentage range of 7.3 — 9.0 is comparable to that of 4.1 — 5.2 shown above, the latter percentage range being based on total ovules and the former on the total seed harvested. Again these data emphasize the relatively limited occurrence of cross-pollination in *C. arabica*.

LITERATURA CITADA

1. Cramer, J. S. and P. C. van der Wolk. *Em Fruwirth, C. Handbuch der landwirtschaftlichen Pflanzenzüchtung. Kaffee.* 5 : 143-161. 1923.
2. Ferwerda, F. P. A evolução do café em Java II. *A Fazenda* 43 : 32-35. 1948.
3. Heribert-Nilsson, N. Versuche über den Vizinismus des Roggens mit einem pflanzlichen Indikator. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 5 : 89-114. 1917.
4. Krug, C. A. Hybridization in Coffee. *Journal of Heredity* 26 : 325-330, fig. 14-18. 1935.
5. Krug, C. A. e A. S. Costa. Criação de variedades melhoradas de café. *A Fazenda* 42 : 35 e 46-47. 1947.
6. Krug, C. A. Melhoramento do cafeeiro. *Revista da Super. dos Serviços do Café de São Paulo* 20 : 863-872. 1945.
7. Tashdjian, E. Beobachtung über Variabilität, Dominanz und Vizinismus bei *Coffea arabica*. *Zeitschrift für Züchtung* 17 : 341-354. 1932.
8. Zimmermann, A. *Em Kaffee.* Auslandsbücherei, Berlin. 1928.

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

XII — UMA NOVA FORMA TETRAPLÓIDE (1)

A. J. T. MENDES

Engenheiro agrônomo, Secção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas

1—INTRODUÇÃO

As variedades de *Coffea arabica* L. em cultura no Estado de São Paulo têm $2n=44$ e são chamadas tetraplóides, uma vez que são conhecidas diversas outras espécies diplóides, tais como : *Coffea canephora* Pierre ex Froehner e *Coffea Deweveri* De Wild. et Th. Dur. com $2n=22$ cromossômios. Em uma propriedade agrícola foi encontrado, há alguns anos, um cafeeiro visivelmente diferente das variedades ali cultivadas, produzindo grande quantidade de frutos e apresentando evidências de grande rusticidade. Este exemplar e sua descendência, bem como numerosos híbridos entre êle e outras variedades, têm sido objeto de extensos estudos por parte das Secções de Genética e de Café, no Instituto Agronômico (3). O presente comunicado versará sobre a citologia desta planta, fichada com o número "387", pela Secção de Genética.

2—NÚMERO DE CROMOSSÔMIOS

Para a determinação do número de cromossômios, utilizaram-se raízes obtidas de estacas, sendo a fixação feita em "Craf" e os cortes do material, incluído em parafina, coloridos pela hematoxilina. Verificou-se o número somático $2n=44$ cromossômios (fig. 1—A).

3—MICROSPOROGÊNESE E ESTUDO DO PÓLEN

O estudo da microsporangénese foi realizado em botões obtidos de enxertos da planta "387" e que vêm florescendo com regularidade em Campinas. Os botões foram colhidos em uma mistura de álcool absoluto e ácido acético na proporção de 3 : 1 e conservados em refrigerador. Do fixador, as anteras foram passadas diretamente para uma lâmina e coloridas pelo carmim acético.

Os estados iniciais da prófase não foram analisados em detalhe. Em diáquinese (est. 1—A) os cromossômios apresentam o aspecto característico, já verificado em outras espécies e híbridos de *Coffea* (1, 4, 5, 6), isto é, uma parte é bem colorida, enquanto uma ou as duas extremidades se coloreem tão fracamente que, muitas vèzes, se perdem de vista. Na zona bem colorida situa-se o centrômero e os cromossômios repelem-se nessa região. Os

(1) Trabalho apresentado à Segunda Semana de Genética, realizada em Piracicaba, em fevereiro de 1949.

quiasmas se dão na parte pouco colorida e muitas vezes passam despercebidos; é possível, nessa fase, analisar o pareamento dos cromossômios, porém a falta de coloração, em uma ou nas duas extremidades, faz com que muitas vezes se contem univalentes onde, na realidade, há bivalentes. Em três células fizemos a seguinte observação sobre o pareamento (quadro 1):

QUADRO 1.—Pareamento dos cromossômios em diacinese no Café "387"

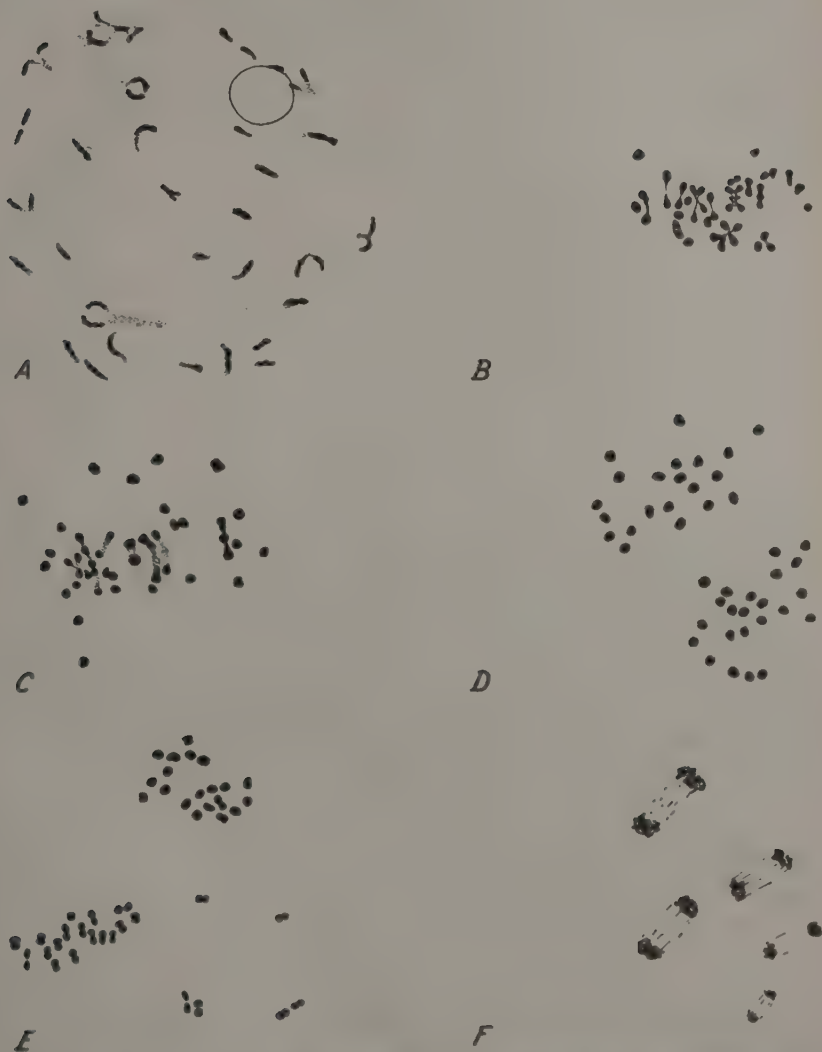
Número de células	Número de cromossômios		
	Univalentes	Bivalentes	Trivalentes
1	15	13	1
1	22	11	..
1	24	10	...

Em doze células, em metáfase I (est. 1-B), observamos a seguinte valência dos cromossômios (quadro 2):

QUADRO 2.—Pareamento dos cromossômios em metáfase I no Café "387"

Número de células	Número de cromossômios			
	Univalentes	Bivalentes	Trivalentes	Tetравalentes
1	5	18	1	...
1	10	15	0	1
1	11	12	3	...
2	12	16	.	.
3	14	15	.	.
1	16	14
2	18	13
1	27	5	1	1

Verifica-se, desde logo, que o pareamento dos cromossômios é anormal. Irregular também é a anáfase I (est. 1-C), onde se observa distribuição não equitativa dos cromossômios para os dois pólos e a existência de cromossômios, em número de 0 a 6, perdidos no citoplasma entre os dois pólos. Consequentemente, em metáfase II (est. 1-D), os núcleos se apresentam em geral com números diferentes de cromossômios. O quadro 3 mostra o resultado das contagens realizadas nos dois pólos de 50 células em anáfase I ou metáfase II:



Microsporogênese na planta "357" ($\times 1070$): A — diacinese; B — metáfase I; C — anáfase I; D — metáfase II, 21 - 23 cromossomos; E — metáfase II, vendo-se "lagers" divididos; F — anáfase II, vendo-se 5 grupos de cromossomos em divisão; esquema obtido sem câmara clara.

QUADRO 3.—Número e frequência de cromossômios nos pólos em anáfase I, metáfase II e em anáfase II, no Café "387"

Número de cromossômios	Frequência	
	Anáfase I e Metáfase II	Anáfase II
15	2	2
16	3	1
17	4	0
18	5	0
19	12	3
20	14	3
21	36	0
22	10	3
23	8	...
24	3	
25	2	
26	0	
27	1	
28		
Total	100	12

Em anáfase II verifica-se ainda, às vezes, a existência de "laggards", porém a tendência é para a distribuição equitativa dos cromossômios (est. 1—E). Quando da anáfase I resulta um número de núcleos superior aos dois normais, nota-se, às vezes, que em todos eles se processa a anáfase II (est. 1—F). Pudemos efetuar contagens em 12 núcleos resultantes da segunda anáfase, obtendo os resultados constantes do quadro 3. Estas contagens mostram que os microsporos são formados com um mínimo de 15 cromossômios e um máximo de 28.

Terminadas as duas divisões, é grande o número de microsporocitos com mais de quatro células, sendo, em geral, quatro células grandes e uma ou mais pequenas (quadro 4):

QUADRO 4. Número e percentagem de microsporocitos com diferentes números e tipos de células em 311 contagens feitas na planta "387"

Células		Microsporocitos	
Grandes	Pequenas	Contagens	Percentagem
2 a 3	1 a 4	23	7,3
4	0	123	39,6
4	1 a 4	138	44,4
5 a 6	0 a 1	27	8,7
Total		311	100,0

Os grãos de pólen maduros são muito variáveis em tamanho e correm-se diferentemente pelo carmim acético. Enquanto uns se colorem rapidamente, outros ficam praticamente incolores. Supondo que estes últimos são “anormais” e os primeiros “normais”, fizeram-se as seguintes contagens (quadro 5) :

QUADRO 5.—Contagens e percentagens de grãos de pólen “normais” e “anormais” em cinco lâminas no “387”

Grãos de pólen	Lâminas					Total	Percentagem
	1	2	3	4	5		
Normais	23	28	29	35	40	155	31
Anormais	77	72	71	65	60	345	69
Total	100	100	100	100	100	500	100

Os grãos “normais” foram medidos em seis lâminas com o auxílio de uma ocular micrométrica 6x e uma objetiva 40x, de forma que cada divisão da ocular valia 2,3 micra. O quadro 6 mostra como são variáveis, em tamanho, esses grãos de pólen ; a frequência maior está entre 15 e 16 divisões da ocular, tendo sido obtido o valor de 15,3 divisões da ocular para a média compensada, correspondente a 35,2 micra.

QUADRO 6.—Medições dos grãos de pólen em seis lâminas no café “387”

Lâminas	Número de divisões da ocular													Total	
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		23
1	...	1	7	15	16	17	21	8	10	3	1	1	100
2	...	2	8	12	18	20	14	13	7	3	1	2	100
3	8	17	31	25	16	2	1	100
4	1	4	5	11	19	24	19	8	7	1	...	1	100
5	2	6	20	27	30	7	2	1	1	3	...	1	100
6	2	16	26	20	31	3	1	1	100
Total	1	7	22	54	106	145	129	83	31	10	4	7	0	1	600

Os grãos de pólen “normais” são esféricos, apresentando dois núcleos perfeitamente distintos : um esférico (vegetativo) e um fusiforme (reprodutivo).

Em lâminas preparadas com um filme de ágar a 0,5% e 10% ou 15% de sacarose, procedeu-se à sementeação do pólen, conservando-as, a seguir.

em câmara úmida, à temperatura ambiente. Êste é o processo usual para o estudo da germinação de pólen do cafeeiro ; no entanto, não se obteve germinação alguma no presente caso.

4—HIBRIDAÇÕES REALIZADAS

A planta "387" foi utilizada em cruzamentos diversos, ora fornecendo o pólen, ora sendo polinizada por outras. Na suposição de que se tratasse de uma forma tetraplóide de *Coffea Dewevrei*, procurou-se cruzá-la com indivíduos tetraplóides dessa espécie, experimentalmente produzidos. De numerosas flores polinizadas, obteve-se reduzido pegamento e apenas alguns híbridos foram conseguidos.

Tendô-se tentado cruzá-la com um exemplar diplóide ($2n=22$) de *C. Dewevrei*, apenas uma planta foi obtida.

As hibridações com *C. arabica* foram numerosas e o sucesso foi grande ; a Secção de Genética tem, em estudo, muitas centenas de plantas que ali se obtiveram de tais cruzamentos (3).

5—NÚMERO DE CROMOSSÔMIOS NOS HÍBRIDOS E NA PROGENIE

A determinação do número de cromossômios, nas plantas, foi feita em pontas de raízes, coloridas pelo método da hematoxilina.

Entre os híbridos do "387" com *C. Dewevrei* tetraplóide, obteve-se uma planta com $2n=44$ (fig. 1—B), uma com $2n=33$ (fig. 1—C) e uma com $2n=43$ cromossômios (quadro 7).

QUADRO 7.—Número somático de cromossômios em híbridos do "387" com *C. Dewevrei* tetraplóide

Plantas cruzadas	Número dos híbridos	Número de cromossômios
387 x Co 234	H. 1405-1	44
387 x Co 234	H. 1538-2	33
387 x Co 239	H. 1406-1	43

O híbrido obtido entre o "387" e *C. Dewevrei* diplóide (63 x 387) recebeu o número H. 476-1, e é triplóide ($2n=33$).

De algumas das hibridações entre o "387" e *C. arabica*, realizadas pela Secção de Genética, verificou-se o número de cromossômios, em 29 plantas, como se vê no quadro 8 :

QUADRO 8.—Número somático de cromossômios em híbridos do "387" com *C. arabica*

Plantas cruzadas	Número dos híbridos	Número de cromossômios
387 enx. 3 x 1-2 (<i>bourbon</i>)	H 1499-20	43
	-31	43
	-12	44
	-19	44
	-18	45
	-37	45
	-16	46 ⁽¹⁾
387 enx. 3 x 33-11 (<i>laurina</i>)	H 1500-26	43
	-19	44
	-10	45
	-45	45 ⁽²⁾
	-27	45+1 ⁽³⁾
387 enx. 3 x 34-10 (<i>mokka</i>)	H 1501-19	42
	-35	43
	-12	44
	-51	44
	- 4	46
	-11	46
387 enx. 4 x 300-20 (<i>maragogipe</i>)	H 1503- 1	45
	- 7	46
387 enx. 4 x 376 (<i>bourbon</i>)	H 1504- 5	44
	-10	44
	- 1	45
	- 2	45
387 enx. 9 x 376 (<i>bourbon</i>)	H 1515-12	43
	- 2	44
	-11	44
	-10	45
	- 7	46

(¹) Ver fig. 1-D; (²) ver fig. 1-E; (³) 45 cromossômios e mais um fragmento.

As frequências das plantas com diferentes números, de cromossômios somáticos, que se acham especificadas no quadro 8 são as seguintes:

NÚMERO DE CRÔMOSSÔMIOS	Frequência
42	1
43	5
44	9
45	8
45+1 f.	1
46	5
Total	29

Uma única planta proveniente de semente autofecundada artificialmente do "387" foi examinada, verificando-se possuir $2n=45$ cromossômios.

6—DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A planta "387" difere dos representantes da espécie *C. arabica* em numerosos caraterísticos, sendo de muita importância o fato de ser praticamente auto-estéril, enquanto as variedades de *C. arabica* são autoférteis. Ela se aproxima de *C. arabica* quanto ao número de cromossômios, pois tem $2n=44$, como as variedades desta espécie. Em sua auto-esterilidade se assemelha, entretanto, às espécies diplóides de *Coffea*. Por diversos caraterísticos se aproxima da espécie *C. Dewevrei*, que tem $2n=22$ cromossômios. A princípio pensou-se ser o cafeeiro "387" um representante autofértil da espécie *C. liberica* Hiern; mais tarde sugeriu-se que se tratava de uma forma tetraplóide de *C. Dewevrei*.

O estudo da microsporogênese mostrou a rara formação de cromossômios tri- e tetravalentes, os quais deveriam ser esperados, no caso de se tratar de uma planta autotetraplóide. A existência de univalentes, em grande número, sugere, no entanto, tratar-se de um híbrido.

Se os cromossômios de *C. Dewevrei*, no híbrido tetraplóide, estão aí representados pelo seu inteiro complemento diplóide, é de se esperar que formem, nos microsporocitos, 11 bivalentes; os cromossômios de *C. arabica*, representados apenas pelo seu complemento haplóide, formariam univalentes; contar-se-iam, portanto, nos microsporocitos, $22_I + 11_{II}$. Porém, já se sabe que no complemento haplóide de *C. arabica* os cromossômios mostram uma certa homologia, pois 0 a 6 bivalentes se formam no haplóide conhecido como *monosperma* (5). É de se esperar, portanto, que nos microsporocitos do "387" apareçam os 11 bivalentes de *C. Dewevrei* mais 0 a 6 bivalentes de *C. arabica*, isto é, encontrar-se-ão 11 a 17 bivalentes e os restantes cromossômios, como univalentes, em número de 22 a 10. Como no *monosperma* são mais frequentes 0, 1 e 2 bivalentes, no "387" devem ser mais frequentes, em ordem decrescente, as configurações de $22_I + 11_{II}$, $20_I + 12_{II}$ e $18_I + 13_{II}$.

Na realidade, dez, das doze células examinadas em metáfase I, apresentavam 12 a 16 bivalentes e 18 a 10 univalentes, isto é, uma variação cuja amplitude está dentro da esperada. Não se nota, porém, uma frequência decrescente de bivalentes em número de 11, 12 e 13.

Se fôr certa a hipótese da existência, no "387", de 22 cromossômios *Dewevrei* e 22 *arabica*, deve-se concluir que neste ambiente os cromossômios *arabica* têm uma tendência maior para a auto-sinapse do que no ambiente existente no haplóide de *C. arabica*.



FIGURA 1.—Metáfases somáticas em pontas de raízes ($\times 2140$): A — planta "387", $2n=44$; B — H 1405-1 ($387 \times C. Dewevrei$ tetraplóide), $2n=44$; C — H 1538-1 ($387 \times C. Dewevrei$ tetraplóide), $2n=33$; D — H 1499-16 ($387 \times C. arabica$), $2n=46$; E — H 1500-45 ($387 \times C. arabica$), $2n=45$.

As irregularidades meióticas dão, em consequência, a formação de grãos de pólen com 15 a 28 cromossômios e deve-se atribuir a isto a variabilidade do tamanho dos microsporos. Os grãos pequenos e também variáveis que, frequentemente, se formam devem conter os cromossômios que, durante a meiose, não se incluíram nos 4 núcleos principais. Êles naturalmente são estéreis, mas, além desses grãos pequenos, numerosos grãos de tamanho regular deixaram de se colorir pelo carmim acético e foram também considerados como sendo estéreis. Êstes últimos, provavelmente, também contêm um menor número de cromossômios.

Se os bivalentes de *Dewevrei* se dividirem normalmente, os grãos de pólen deverão conter sempre 11 cromossômios desta espécie, isto é, o complemento haplóide inteiro. Os restantes cromossômios, em número variável, seriam do complemento *arabica*. Um grão de pólen com 11 cromossômios *Dewevrei* deve ser fértil e, consequentemente, pode-se supor que os grãos de pólen com 15 a 28 cromossômios, tendo 11 *Dewevrei* e 4 a 17 *arabica*, sejam férteis, sendo-lhes comunicada esta fertilidade pelo genômio *Dewevrei*, a não ser que este número variável de cromossômios *arabica* determine um desequilíbrio genético.

O fato de não se ter conseguido a germinação do pólen no laboratório, só pode ser explicado por deficiência do meio nutritivo, pois que polinizações em campo deram, muitas vezes, resultados bem satisfatórios.

Examinando o quadro 3, que mostra a contagem de cromossômios nos pólos em anáfase I e em metáfase II, verifica-se que 80% dos núcleos têm 20 a 24 cromossômios e que, do total, 36% têm 22 cromossômios. É então de se esperar que, se o "387" for cruzado com uma planta tetraplóide, onde haja normal formação de pólen com $n=22$, a progênie seja constituída de plantas com número somático de cromossômios desde 37 até 50, porém a grande frequência será de plantas com 42 a 46 cromossômios, com predominância das de $2n=44$.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

a) Na hibridação do "387" com *C. Dewevrei* tetraplóide ($2n=44$), duas plantas têm 43 e 44 cromossômios e, portanto, se situam dentro dos limites acima; uma terceira, porém, é triplóide ($2n=33$)

e sua origem pode ser explicada pela união de um gameta com $n=22$ do "387" e um gameta duplamente reduzido ($n=11$) do *Dewevrei* tetraplóide, ou vice-versa.

b) Na hibridação do "387" com *C. Dewevrei* diplóide ($2n=22$), o híbrido é triplóide ($2n=33$), como se deve esperar da união de um gameta com $n=22$ do "387" com gameta normal ($n=22$) do *Dewevrei* diplóide.

c) Na hibridação do "387" com *C. arabica*, esta deve ter sempre contribuído com pólen de $n=22$; no entanto, os 29 híbridos apresentam 42 a 46 cromossômios, com predominância dos de $2n=44$ e $2n=45$.

Os dados destas três hibridações referem-se quase que exclusivamente a casos em que o "387" serviu como planta-mãe. Estes dados, e mais o fato de se ter verificado $2n=45$ em uma planta de semente autofecundada do "387", vêm confirmar, plenamente, os dados citológicos obtidos no estudo da microsporogênese: a planta produz gametas férteis com $n=20$ a 24 cromossômios, sem excluir a possibilidade de serem férteis também os gametas com outros números de cromossômios.

O exame do pólen revelou que 31% dos grãos são anormais e, aparentemente, estéreis. Do lado feminino, tendo-se verificado que devem existir as mesmas anomalias, aproximadamente 31% das oosferas também serão estéreis. Consequentemente, uma grande parte dos óvulos deve abortar, reduzindo a produção e determinando a formação de frutos com uma única semente.

Como foi assinalado na introdução, a produção de frutos no "387" é alta; estes, porém, são muitas vezes desprovidos de sementes e, portanto, partenocárpicos e frequentemente têm uma única semente do tipo "moca", confirmando a referida suposição.

7—SUMÁRIO

Um cafeeiro muito rústico e altamente produtivo, encontrado em uma propriedade agrícola do Estado de São Paulo, revelou ser tetraplóide ($2n=44$). Neste particular ele se assemelha à espécie *C. arabica*; porém, em sua auto-esterilidade, se aproxima das espécies diplóides ($2n=22$) de café. Imaginou-se, a princípio, que se tratava de uma forma tetraplóide espontânea de *C. liberica* ou de *C. Dewevrei*. O estudo aqui apresentado, porém, conduz à conclusão de que se deve tratar de um híbrido entre *C. arabica* e *C. Dewevrei*.

No estudo da microsporogênese verificou-se a formação de uni- e bivalentes e mais raramente de tri- e tetravalentes. Supondo que o complemento cromossômico desta planta seja constituído de 22 cromossômios *arabica* haplóides e 22 cromossômios *Dewevrei* diplóides, e sabendo-se que: a) os cromossômios de *C. arabica* num indivíduo di-haplóide ($2n=22$) formam 0 a 6 bivalentes; e b) os cromossômios de *C. Dewevrei* formam normalmente 11 bivalentes, infere-se que a planta em estudo deve apresentar 11 a 17 bivalentes. Os bivalentes encontrados mais comumente, na realidade, variavam de 12 a 16 e, portanto, dentro daqueles limites. Isto justifica a hipótese de se tratar de um híbrido entre *C. arabica* e *C. Dewevrei*.

A distribuição anafásica dos cromossômios é irregular, havendo for-

mação de grãos de pólen com $n=15$ a 28 cromossômios ; mais frequentes, porém, (cêrca de 80%), são os grãos com $n=20$ a 24.

A determinação do número de cromossômios em híbridos dêsse cafeeiro com *C. arabica* ($2n=44$), *C. Dewevrei* ($2n=22$) e *C. Dewevrei* ($2n=44$), como fornecedores de pólen, mostrou que também da macrosporogênese resultam oosferas férteis com $n=20$ a 24 cromossômios.

Cêrca de 31% dos grãos de pólen são estéreis. Se na macrosporogênese as mesmas anormalidades ocorrem, é de se esperar que muitos óvulos degenerem. Isto acontece realmente, havendo grande número de frutos sem sementes ou providos de uma única semente em vez de duas.

SUMMARY

A very vigorous and productive coffee plant found in a plantation in the State of São Paulo was studied and found to be a tetraploid ($2n=44$). In this respect it appeared to be similar to the species *C. arabica* but in its self-sterility it seemed to be more like the diploid types ($2n=22$) of coffee. It was at first thought that this plant could be a tetraploid form of a diploid species such as *C. liberica*, or *C. Dewevrei*. The study presented herein, however, reaches the conclusion that this coffee plant is more likely to be the result of hybridization between *C. arabica* and *C. Dewevrei*.

In a study of microsporogenesis it was observed that uni — and bivalents and less frequently tri — and tetravalent chromosomes were formed. If one assumes that the somatic complement of this plant is made up of the 22 haploid *arabica* chromosomes plus the 22 diploid *Dewevrei* chromosomes, then it can be estimated that the *arabica* chromosomes will form 0 to 6 bivalents as is known from the study of a haploid plant of *C. arabica* ; and if the *Dewevrei* chromosomes form 11 bivalents, then in the microsporocytes of the hybrid one would expect to find 11 to 17 bivalents ; in the present study we found most frequently 12 to 16 bivalents which is within these limits. This, then, supports the hypothesis that the plant studied is a hybrid between *C. arabica* and *C. Dewevrei*.

Study has shown that anaphasic distribution of the chromosomes is irregular and that pollen grains are formed with $n=15$ to 28 chromosomes ; most frequently (ca. 80%) the grains have $n=20$ to 24.

Controlled hybrids were made using this plant as the mother tree and *C. arabica* ($2n=44$), *C. Dewevrei* ($2n=22$) and *C. Dewevrei* ($2n=44$), as sources of pollen. A study of the chromosome numbers in these hybrids showed that fertile eggs were formed with $n=20$ to 24 chromosomes.

In the plant studied approximately 31% of the pollen grains were observed to be sterile. It was also observed that some ovules do not develop and one frequently encounters empty or only-one-seeded fruits. It is suggested that the sterility of the ovule and pollen grains may be due to the same factors.

LITERATURA CITADA

1. Krug, C. A. e A. J. T. Mendes. Cytological Observations in *Coffea*. IV. Jour. of Gen. 39 : 189-203. 1940.
2. Krug, C. A. e A. J. T. Mendes. Conhecimentos gerais sobre a Genética e a Citologia do gênero *Coffea*. Rev. de Agric. de Piracicaba 18 : 399-408. 1943.
3. Krug, C. A., J. E. T. Mendes, A. Carvalho e A. J. T. Mendes. Uma nova forma de *Coffea*. Bragantia (no prelo).
4. Medina, D. M. Observações citológicas em *Coffea* : XVI. Microsporogênese e estudo do pólen em *C. arabica* L. var. *rugosa*. Bragantia (no prelo).
5. Mendes, A. J. T. e Osvaldo Bacchi. Observações citológicas em *Coffea*. V. Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. Jor. de Agron. de Piracicaba 3 : 183-206. 1940.
6. Mendes, C. H. T. Observações citológicas em *Coffea* : XIV. Microsporogênese em *C. canephora*. Bragantia (no prelo).

INTRODUÇÃO AO ESTUDO DA AUTO-ESTERILIDADE NO GÊNERO *COFFEA* (1)

CÂNDIDA H. T. MENDES (2)

Engenheiro agrônomo, Secção de Citologia, Instituto Agrônomo de Campinas

1—INTRODUÇÃO

As observações sobre a auto-esterilidade nas espécies diplóides de café tiveram início nas Índias Holandesas, principalmente em Java, onde alguns lotes contendo grande número de plantas de um mesmo clone de *Coffea canephora* Pierre ex Frœhner (café Robusta) constituíram verdadeiro fracasso quanto à produção. Segundo Ferwerda (4), este fato, acrescentado de certas observações, tais como o aumento de produção na mesma cultura monoclonal, quando esta era formada por um número pequeno de plantas e quando era intercalada com clones diferentes, a existência de maior frutificação nas fileiras externas dos grandes complexos monoclonais rodeados de outros clones diferentes e o insucesso de autopolinizações artificiais em café Robusta e Libérica, (*Coffea liberica* Hiern), realizadas por diversos pesquisadores, conduziu-o a uma série de experiências para estudar as condições de fecundação nessas espécies. A conclusão foi de que o café Robusta é auto-estéril e que a interesterilidade dos seus clones é relativamente rara. Este mesmo autor verificou ainda que as espécies *C. liberica* e *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur. var. *excelsa* Chevalier (café Excelsa) são também auto-estéreis.

Os estudos citológicos em espécies diplóides de café, realizados por Faber (3) e por Leliveld (5), são bem conhecidos. Segundo Faber (3), tanto a formação do saco embrionário como a do pólen são normais, sendo também normal a germinação do pólen em meios nutritivos. Faber (2) ainda observou nas espécies *C. canephora* (Robusta) e *C. liberica* que o pólen estranho, caindo sobre o estigma de uma flor, caminha muito mais rapidamente do que o pólen da própria flor, realizando a fertilização em cerca de metade do tempo. Com relação a este assunto, o autor sugere que diferenças ou semelhanças químicas sejam responsáveis por ele, inativando ou excitando o crescimento dos tubos polínicos dentro do estilo, respectivamente nos casos de autopolinização e cruzamento. Leliveld (5), no estudo feito sobre a formação do saco embrionário em diversas espécies e variedades, também concluiu que ela é normal.

(1) Trabalho apresentado na Segunda Semana de Genética, realizada em Piracicaba, de 8 a 12 de janeiro de 1949.

(2) Agradecemos ao Eng. Agr.º Antônio José Teixeira Mendes, chefe da Secção de Citologia, a orientação que nos deu para o presente trabalho.

Uma série de estudos semelhantes começou a ser efetuada pela Secção de Citologia, em 1943, com a finalidade de determinar o grau de auto-esterilidade das espécies diplóides da coleção de cafeeiros do Instituto Agromômico e as causas principais que a determinam.

Êstes estudos foram iniciados usando-se vários representantes da espécie *C. canephora*. Um grande número de autopolinizações artificiais foi realizado, a fim de se verificar o grau de auto-esterilidade apresentado por êsses cafeeiros. Comprovada a auto-esterilidade dessas plantas, efetuou-se, a seguir, um grande número de cruzamentos entre essas plantas, a fim de se determinarem as combinações compatíveis. Ao mesmo tempo foram feitas observações citológicas relativas à formação do pólen e do saco embrionário e sobre o comportamento dos tubos polínicos nos casos de autopolinizações artificiais e de polinizações cruzadas. Outras observações ainda foram feitas sobre as dimensões do pólen, seu poder germinativo e as possibilidades de sua conservação.

Pormenores dessas observações serão dados em trabalhos posteriores, onde serão enumeradas as diversas plantas estudadas, o número de flores utilizadas nas polinizações, o material usado nos estudos citológicos e os dados numéricos obtidos.

Neste trabalho será apresentado apenas um resumo dos estudos feitos sobre a auto-esterilidade dos representantes da espécie *C. canephora* da coleção de Campinas.

2—PESQUISAS EM *C. CANEPHORA*

2.1—ESTUDOS GENÉTICOS

Apesar do grande número de autopolinizações artificiais realizadas em vinte plantas dessa espécie, não se encontrou nenhuma que produzisse frutos, nem mesmo em percentagem baixa, como relatam Ferwerda (4) e Thomas (7).

Entre as 71 combinações efetuadas, 15 foram do tipo considerado recíproco, isto é, combinações nos dois sentidos entre duas plantas diferentes. Do total das 71 combinações, 36 mostraram-se compatíveis e 35 incompatíveis. Das 15 combinações recíprocas, 6 foram reciprocamente férteis, sendo as demais compatíveis apenas num sentido. Provavelmente isto ocorreu em virtude de alguns cruzamentos terem sido feitos com maior número de flores do que outros, ou realizados um maior número de vezes. Num trabalho semelhante, Ferwerda (4) encontrou 62 combinações compatíveis entre as 72 que efetuou, sendo que, dos 28 cruzamentos recíprocos, 21 foram reciprocamente férteis.

Além das combinações entre plantas, foi realizado um grande número de "backcrosses", numa tentativa de esclarecer o mecanismo genético da auto-esterilidade, o qual talvez possa ser explicado pela existência de "oppo-

sitional factors", como os descobertos para *Nicotiana* por East e seus colaboradores (1).

Com relação à percentagem de fecundação, isto é, percentagem de sementes formadas em relação ao número inicial de óvulos, podem ser considerados baixos os resultados obtidos nas combinações compatíveis da espécie *C. canephora*: dos 41 cruzamentos frutíferos obtidos, apenas 12 tiveram uma percentagem superior a 30%, enquanto, em cruzamentos entre plantas da variedade *bourbon*, da espécie *C. arabica*, se conseguem percentagens superiores a 50%, atingindo mesmo a 86,3%.

As sementes obtidas dessas combinações compatíveis são normais, sendo desprezível a percentagem das que não possuem embrião. Semeadas em caixas de Petri, não têm germinado bem, devido a ataques de fungos e bactérias, o que ocorreu com grande intensidade, principalmente em 1948.

2.2—ESTUDOS CITOLÓGICOS

2.2.1—MICROSPOROGÊNESE

Pelo exame de células-mãe do pólen nos diversos estágios de seu processo meiótico, não se observou nenhuma anomalia durante o pareamento ou durante a separação dos cromossômios. Os grãos de pólen resultam da separação simultânea dos quatro núcleos telofásicos, com onze cromossômios cada um. Uma percentagem muito pequena (6%) apresenta um número um pouco diferente, geralmente dez ou doze. Nas fases de diakinese e início de anáfase I foram observados cromossômios com um, dois e três quiasmas.

2.2.2—MACROSPOROGÊNESE

Estudou-se a formação do saco embrionário em flores colhidas em diversas idades, desde a véspera da abertura das flores, até quinze dias após, geralmente com intervalos de um dia. Algumas dessas flores foram emasculadas antes da deiscência das anteras e, em seguida, protegidas com um saco de papel; outras foram apenas protegidas. Em qualquer caso, porém, não houve contaminação por pólen estranho. Examinou-se um número variável de óvulos, nunca menos de cinco e, comumente, quinze ou mais, para cada idade.

Depois de formado, o saco embrionário em *C. canephora* se apresenta, como já foi descrito por Faber (2) e Leliveld (5), com duas sinérgidas e uma oosfera na região micropilar, três antípodas na região chalazal e dois núcleos polares no centro.

Comparando-se com *C. arabica* (6), onde o saco embrionário se acha formado quando da abertura das flores, o processo em *C. canephora* pode ser considerado mais lento, só se encontrando sacos embrionários completos no dia seguinte ao da abertura das flores. Ao contrário do que foi observado por Faber (3), a macroporogênese se completa independentemente de poli-

nização ; também é independente dela a fusão dos núcleos polares e de seus nucléolos, em contraste com o que foi observado por Mendes (6) em *C. arabica*, onde esta fusão não se realiza quando não há fertilização.

2.2.3—ESTUDO DO PÓLEN

O pólen de *C. canephora* apresenta, geralmente, 92 a 96% de grãos normais, percentagens essas quase iguais à de *C. arabica*, que é de cerca de 98%.

Apesar de normais, os grãos de pólen apresentam uma grande variação no seu tamanho, não só considerando-se plantas diferentes, como uma mesma planta. Esta variação é tão grande que, analisando-se estatisticamente os dados obtidos de medições rigorosas, se chegou à conclusão de que este caráterístico não serve para a identificação da espécie *C. canephora*, como se esperava.

Para se ter uma idéia do seu poder germinativo e da sua longevidade, foram feitas experiências de germinação em lâminas, com meios artificiais. Dos meios experimentados, o que deu melhores resultados foi o constituído por uma solução de ágar a 0,5% e 10,0% de açúcar de cana. A percentagem de germinação obtida foi sempre baixa, tendo a melhor lâmina, com pólen colhido no mesmo dia da abertura das flores, dado apenas 55,2% de grãos germinados. Em *C. arabica*, nas mesmas condições de melhor meio artificial, encontraram-se 83% de germinação, sendo desconhecidas as causas dessa diferença. Apesar dessa baixa percentagem, os tubos polínicos formados são longos e normais, e em quantidade suficiente para realizar uma boa fertilização, desde que, tendo sido feitas sempre polinizações artificiais, a quantidade de grãos levados a cada estigma foi grande.

Foram realizadas algumas experiências de conservação do pólen colhido no mesmo dia da abertura das flores, combinando as temperaturas ambiente, 0°C e 10°C, com as umidades relativas de 10% e 30%, obtidas com soluções de ácido sulfúrico. Observou-se que o pólen de *C. canephora* sofre oscilações muito grandes e uma queda muito rápida no seu poder germinativo. Este poder se conserva cerca de quarenta e cinco dias, quando o pólen é guardado a 0°C de temperatura e 10% de umidade relativa. Considerando muito baixa uma percentagem de germinação de 10%, pode-se dizer que este pólen, mesmo nessas condições de ambiente de conservação, que foram as melhores experimentadas, não dura mais que seis dias.

2.2.4—PENETRAÇÃO DO TUBO POLÍNICO

Examinou-se, ao microscópio, o crescimento dos tubos polínicos somente através do estilo, nos casos de autopolinizações e cruzamentos compatíveis. O exame do estilo de flores autopolinizadas foi feito a intervalos de 7, 12, 24 e 47 horas após a polinização, examinando-se cada vez um mínimo de cinco estilos. O exame dos estilos que receberam pólen estranho, compatível, foi feito 15, 20, 40, 45 e 65 horas depois de polinizados, examinando-se também, para cada caso, um mínimo de cinco estilos.

Nas autopolinizações notou-se que a quantidade de grãos germinados é muito pequena e que os tubos polínicos formados, apesar de normais, são muito curtos, nunca excedendo ao comprimento das papilas estigmáticas.

Nos cruzamentos que foram compatíveis, a quantidade de grãos germinados é muito elevada e os tubos polínicos são encontrados em grande número dentro do estilo. Entretanto, relativamente a *C. arabica*, onde iguais observações foram realizadas, o crescimento dos tubos polínicos, dentro do estilo de *C. canephora*, é mais lento, gastando mais de vinte e quatro horas para alcançar o ovário.

3—DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As pesquisas sobre a auto-esterilidade da espécie *C. canephora*, realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas, têm demonstrado que todos os exemplares dessa espécie até agora examinados são auto-estéreis, apresentando percentagem de fecundação nula quando autopolinizados artificialmente.

As combinações compatíveis encontradas equivalem a 50% das combinações realizadas, enquanto Ferwerda (4) encontrou 86% em seus trabalhos realizados em Java. Comparando os dados de combinações recíprocas, encontramos apenas 66% compatíveis reciprocamente, enquanto esse mesmo autor encontrou 75%. Pode-se dizer, então, que a interesterilidade dos exemplares de *C. canephora* aqui estudados é mais comum do que em Java, podendo, talvez, isto ser explicado pela maior homogeneidade genética desse material.

Examinando a formação do pólen e do saco embrionário, verificou-se que ambos os processos são normais, e que os sacos embrionários só se acham completos no dia seguinte ao da deiscência das anteras.

A germinação do pólen em meio nutritivo conveniente é relativamente baixa (cerca de 55%), sendo perfeitamente normais os tubos polínicos dos grãos de pólen germinados.

Apesar dessa percentagem baixa de germinação, o pólen usado nas polinizações artificiais foi em quantidade suficiente para promover uma boa fertilização. Daí se deduz que a pequena percentagem de fecundação encontrada, nos cruzamentos compatíveis, e a alta percentagem de cruzamentos incompatíveis não devem ser devidas a anomalias na germinação dos grãos de pólen.

Comparando-se, ao microscópio, a germinação do pólen em estilos, em casos de autopolinizações e cruzamentos compatíveis, observa-se que, enquanto um pólen estranho, compatível, produz tubos polínicos que descem ao longo do estilo, os tubos polínicos formados pelo próprio pólen não atingem mais do que o comprimento das papilas estigmáticas. Deve ser esta, portanto, a explicação da auto-esterilidade verificada nesta espécie.

O mecanismo genético que controla o crescimento dos tubos polínicos ainda não foi estabelecido. Entretanto, pesquisas estão em prosseguimento, no sentido de verificar se se trata de um mecanismo controlado por fatores genéticos, como se encontra no gênero *Nicotiana*.

4—RESUMO

Após fazer a revisão de alguns dos principais trabalhos sobre a auto-esterilidade no gênero *Coffea* efetuados em Java, foram relatados, de modo resumido, os resultados das pesquisas genéticas e citológicas que estão sendo feitas com os exemplares da espécie *C. canephora* no Instituto Agronômico de Campinas. Estes estudos têm por finalidade conhecer o grau e as causas da auto-esterilidade dessas plantas.

As autopolinizações realizadas indicaram que êsses cafeeiros são, realmente, auto-estéreis. Dos cruzamentos feitos, cerca de 50% se mostraram compatíveis.

Tanto a formação do saco embrionário como a do pólen são normais.

Em meio artificial conveniente, o pólen apresenta cerca de 55% de germinação, o que foi considerado suficiente para promover a fertilização nos cruzamentos feitos.

Foram realizadas observações sobre o crescimento do tubo polínico em estilos de flores polinizadas com pólen estranho, compatível, e polinizadas com o próprio pólen. Nos cruzamentos compatíveis, o crescimento do tubo polínico é normal. No segundo caso notou-se que, após a germinação, o tubo polínico tem o crescimento paralisado, não ultrapassando a região das papilas estigmáticas. Esta pode ser considerada a explicação da auto-esterilidade nos exemplares de *C. canephora* estudados.

O mecanismo genético que controla o crescimento dos tubos polínicos ainda não pôde ser estabelecido. Entretanto, pesquisas estão em prosseguimento no sentido de se verificar se se trata de um mecanismo genético semelhante ao encontrado no gênero *Nicotiana*.

SUMMARY

This paper presents a review of pertinent literature related to studies of self-sterility in the genus *Coffea* and reports the results of cytological and genetic studies carried out on the species *C. canephora* at the Instituto Agronômico, Campinas, Brasil.

The objective of the study was to determine the degree and causes of self-sterility in the species *C. canephora*.

In tests involving a large number of self-pollinations in flowers of this species, all were self-sterile and formed no seed.

In tests of cross-pollinations involving *C. canephora* approximately 50 percent were effective in the formation of seed.

Cytological studies showed that the formation of the embryo-sac and pollen grains in *C. canephora* can be considered normal. Likewise a study of the pollen of this species on artificial media under controlled conditions, showed 55 percent germination and this was considered sufficient to bring about fertilization.

In contrast, the cytological investigations of self-pollinated flowers showed that the number of pollen grains that germinated was very small and of those that did germinate, the formed pollen-tube was short and did not extend beyond the stigmatic papillae.

Observations on compatible cross-pollinations on *C. canephora* showed that a large number of pollen grains germinated and that usually there were several pollen-tubes within the style. However, the rate of growth of pollen-tubes in *C. canephora* was found to be much slower than in *C. arabica*.

The present investigation has shown that in flowers of *C. canephora* there is a very high degree of self-sterility and this has been related to poor germination of the pollen grains and subsequent limitation in the development of pollen tubes.

LITERATURA CITADA

1. East, E. M. and A. J. Mangelsdorf. A new interpretation of the heredity behavior of self-sterile plants. *Proc. Nat. Ac. Sc.* **11** : 166-171. 1925.
2. Faber, F. C. von. Een en ander over de Biologie der Koffiebloem. *Teysmania* **21** : 556-577. 1910.
3. Faber, F. C. von. Morphologische-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. *Ann. Jardin Bot. Buitenzorg, Java.* 2.^e sér. **10** : 57-160. 1912.
4. Ferwerda, F. P. Die Befruchtungsverhältnisse bei den in Niederländisch-Indien angebauten Kaffeearten. *Der Züchter* **8** : 92-102. 1936.
5. Leliveld, J. A. Fruchtsetting Bij Koffie. *Archiv v.d. Koffiecultuur in Ned. Indie* **12** : 127. 1938.
6. Mendes, A. J. T. Cytological Observations in *Coffea* VI. — Embryo and endosperm development in *C. arabica* L. *Amer. Journ. Bot.* **28** : 784-789. 1941.
7. Thomas, A. S. Types of Robusta Coffee and their Selection in Uganda. *The Trop. Agric. Journ. Ceylon* **89** : 93. 1937.

UM ENROLAMENTO DAS FÓLHAS DO FUMO DE CAUSA GENÉTICA⁽¹⁾

A. S. COSTA, *engenheiro agrônomo, Seção de Genética*, e R. FORSTER, *engenheiro agrônomo, Subdivisão de Estações Experimentais. Instituto Agrônomo de Campinas*

1—INTRODUÇÃO

Um enrolamento das folhas do fumo tem sido observado, há vários anos, em plantações efetuadas em diversas zonas do Estado de São Paulo. Pensou-se, a princípio, que fôsse uma das formas da moléstia encarquilhamento da folha, anteriormente descrita pelos autores (2) e então considerada semelhante ao "tobacco leaf curl".

Estudos de Bennett e Costa (1) mostraram que o encarquilhamento da folha, forma rugosa, é causado por uma estirpe do vírus do "curly top" da beterraba, e os autores verificaram posteriormente que o enrolamento que tinha sido encontrado associado a esta moléstia não é de natureza patológica, mas sim genética.

2—DESCRIÇÃO DO ENROLAMENTO

As plantas com os característicos de enrolamento são menores que as normais da mesma variedade. Os bordos das folhas se enrolam para a face ventral e formam um ângulo mais agudo com a parte superior da haste. O ápice da folha curva-se para cima, em direção à haste. A coloração verde da folha adquire um aspecto vidrado na face ventral, ao passo que, na face dorsal, as áreas intercostais mostram a presença de tecidos anormais de aparência esponjosa e de cor verde mais escura que a do restante da folha. Além disso, as folhas são quebradiças e apresentam excrecências foliares ao longo das nervuras, do tipo de "leaf enation" (est. 1-A). Estas são mais frequentes ao longo da nervura principal, mas também se mostram nas nervuras secundárias. As flores das plantas com enrolamento são mais ou menos normais, sendo tanto o pólen como os óvulos, pelo menos em parte, férteis. A planta, como um todo, não forma muitas cápsulas, aparentemente devido à queda de botões florais e de flores. As mudas muito novas na sementeira não mostram nenhum sintoma de enrolamento, sendo impossível distingui-las de plantas normais da mesma progênie. Só depois da formação de alguns pares de folhas é que começa a manifestação do enrolamento, mas muitas plantas só o mostram muito tarde.

Do ponto de vista comercial, as plantas com enrolamento perdem bastante do seu valor, mesmo quando são usadas para fumo em corda. É,

⁽¹⁾ Trabalho apresentado à "Segunda Semana de Genética", realizada em fevereiro de 1949 na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de Piracicaba, São Paulo.

entretanto, tarefa fácil eliminar os fatores responsáveis pelo característico enrolamento por meio da autofecundação e seleção das plantas destinadas à produção de sementes. A presença de plantas com enrolamento tem sido verificada em lotes da variedade Piraxim e no grupo de variedades denominadas crioulas.

3—ESTUDOS GENÉTICOS

Antes de ser determinada a natureza genética do enrolamento, muitas tentativas infrutíferas de transmissão foram feitas por meio de enxertia, fricção com suco e por meio de insetos vetores, na suposição de que o enrolamento pudesse ser causado por vírus. Diante da impossibilidade de obter transmissão da anomalia, voltou-se a atenção à possibilidade de ser ela devida a fatores genéticos. O plantio de sementes de plantas tipicamente enroladas confirmou esta suposição, obtendo-se uma progênie constituída tão somente de plantas com enrolamento.

Uma vez determinada a natureza genética do enrolamento, planejaram-se os cruzamentos necessários para obtenção de plantas F_2 e de "backcrosses". Embora a análise genética dos dados obtidos nestes cruzamentos não forneça conclusão definitiva sobre a maneira de herança dos gens responsáveis pelo caráter enrolamento, permitem esses dados as seguintes afirmativas: a) Plantas com os característicos bem acentuados de enrolamento são homozigotas para os fatores responsáveis, pois a progênie destas plantas é toda de plantas com enrolamento; b) O F_1 do cruzamento entre plantas normais e com enrolamento é de aparência normal, tanto no cruzamento direto como no recíproco. Isto parece indicar que o enrolamento é devido a fatores recessivos; c) Nas gerações F_2 e nos "backcrosses" nota-se o aparecimento de formas aparentemente intermediárias, em que o caráter enrolamento é mais ou menos acentuado, parecendo assim indicar que mais de um par de fatores controlam a manifestação desse caráter, e que existe também um efeito de dosagem. No quadro 1 estão resumidos os dados obtidos nos cruzamentos até agora feitos.

QUADRO 1. — Natureza das plantas obtidas em cruzamentos entre plantas com folhas mostrando enrolamento e plantas normais

Progênie ou cruzamento	Número de plantas observadas			
	Total	Normais	Intermediárias	Enrolamento
Progênies de plantas com enrolamento acentuado	1081	4	0	1077
F_1 : normal \times enrolamento	66	66	0	0
F_1 : enrolamento \times normal	140	140	0	0
F_2 : normal \times enrolamento	555	484	18	53
"Backcross": enrolamento \times F_1	353	74	120	159
"Backcross": F_1 \times enrolamento	165	46	49	70

¹ A presença de 4 plantas normais é difícil de explicar.

² Esta progênie foi plantada no campo, onde os característicos de plantas intermediárias são mais difíceis de se determinar.



A — Planta adulta mostrando os característicos do enrolamento. B — Enxérto de garfo, de planta com enrolamento, sobre porta-enxérto normal, depois de sete meses; o desfolhamento e a poda da parte normal foram feitos diversas vezes.

A classificação das formas intermediárias nas progênies de F_2 e entre os descendentes de "backcrosses" é um tanto arbitrária, havendo praticamente uma gradação que vai de plantas quase normais até plantas com a dosagem máxima de sintomas.

4—TENTATIVAS PARA PRODUZIR O APARECIMENTO DO CARACTERÍSTICO ENROLAMENTO EM PLANTAS GENÉTICAMENTE NORMAIS

Mesmo depois de ter sido definitivamente determinado que o enrolamento é causado por fatores genéticos, tentou-se induzir o aparecimento desse caráter em plantas normais, por vários métodos. Estas experiências foram baseadas na suposição de que o caráter enrolamento pudesse ser devido à presença de substâncias capazes de se difundirem através dos tecidos ou de se translocarem no floema, e cuja formação fôsse dependente de um mecanismo genético.

Os dois métodos mais usados, por meio dos quais se procurou transferir essa hipotética substância para os tecidos de plantas geneticamente normais, foram : 1) A pulverização repetida de plantas normais com o suco extraído de folhas com enrolamento ; 2) Enxertia de aproximação de plantas normais com garfos de plantas com enrolamento e vice-versa, procurando-se, então, forçar a translocação de substâncias elaboradas da parte enrolada para a parte normal por meio de podas sucessivas, desfolhamento ou pelo sombreamento parcial destas (est. 1-B).

Embora o número de plantas ensaiadas com cada tratamento fôsse bastante reduzido, não se pôde notar nenhuma indicação de que a hipótese inicial tivesse fundamento, não parecendo que as características das plantas com enrolamento sejam determinadas por uma substância difusível através dos tecidos ou capaz de se translocar no floema em doses efetivas.

SUMMARY

A type of leaf-roll has been noticed for many years in commercial tobacco plantings in the State of S. Paulo. Leaf-roll plants were supposed to be affected by a virus disease, but repeated attempts to transmit it by grafting, juice inoculation and by insect vectors failed consistently. Later studies showed that the leaf-roll condition is due to genetic factors and that probably more than a pair of recessive genes are involved in its transmission.

Even after the genetic nature of the leaf-roll condition was definitely established, attempts were made to induce the leaf-roll condition in plants genetically normal by several methods : 1. Spraying their leaves with the juice from leaf-roll plants ; 2. Approach-grafting a leaf-roll scion onto a normal plant and vice-versa, following with defoliation, cutting back or shading of the normal graft component. This was done to stimulate translocation of the phloem contents from the leaf-roll scion or stock into the normal stock or scion respectively. It was thought that if leaf-roll were due to the genetically controlled production of a hormone-like substance, these treatments might induce the leaf-roll condition in plants genetically normal. The results, however, have been negative.

LITERATURA CITADA

1. Bennett, C. W. and A. S. Costa. A curly top disease of tomato and tobacco in Brazil closely resembling curly top of sugar beet in the United States and Argentina. Jour. Agr. Research. (No prelo).
2. Costa, A. S. e R. Forster. Uma suspeita moléstia de vírus do fumo (*Nicotiana tabacum* L.) semelhante a "leaf-curl", presente no Estado de São Paulo. Jornal de Agronomia 2 : 295-302. 1939.

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

XIII — OBSERVAÇÕES PRELIMINARES EM *COFFEA ARABICA* L. VAR. *RUGOSA* K. M. C. ⁽¹⁾

DIXIER M. MEDINA

Engenheiro agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas

1—INTRODUÇÃO

A variedade *rugosa* de *Coffea arabica* L. foi descrita por Krug, Mendes e Carvalho (4), baseando-se as observações em um cafeeiro encontrado no antigo cafézal da Estação Experimental Central de Campinas. Esta planta, que recebeu o número 134, tem sido propagada por enxertia, dela existindo vários exemplares na coleção de cafeeiros dessa Estação Experimental. Difere da variedade *typica* da espécie principalmente por apresentar porte menor, ramos longos e pendentes com internódios curtos, folhas oblanceoladas de lâmina coriácea e de um verde bem escuro, muito ondulada na superfície superior e *rugosa* na face inferior, flores menores, floração pequena e frutificação baixa (4). Para aqueles que estão familiarizados com as variedades de café, as folhas do *rugosa* lembram, pela sua textura, as da variedade *bullata* de *C. arabica* com suas formas hexaplóide ($2n=66$) e octoplóide ($2n=88$).

Os dados até agora obtidos pela Seção de Genética do Instituto Agronômico, embora insuficientes, devido à escassez de florescimento, têm indicado que a variedade *rugosa* parece ser fértil nos cruzamentos com outras variedades de *C. arabica*. Tanto nas progênes como nos híbridos obtidos, até agora não se encontrou nenhum cafeeiro exatamente igual ao original.

Duas hipóteses foram então formuladas, e que poderiam explicar a não transmissão desse caráter:

a) A planta seria uma quimera citológica, sendo a rugosidade das folhas consequência da existência de camadas de células com número múltiplo de cromossômios, não tendo sido afetada a camada geradora dos gametas; b) Uma quimera genética, ocorrida em camada geradora que toma parte na formação das folhas e não na dos gametas.

Satina e Blakeslee (8), por meio de quimeras periclinais em *Datura*, puderam determinar três camadas geratrizes dos diversos tecidos da planta, sendo que a primeira delas é responsável pela epiderme e a segunda, entre outras funções, toma parte na formação dos gametas. As três camadas contribuem para a formação da folha.

⁽¹⁾ Trabalho apresentado à Segunda Semana de Genética, realizada em Piracicaba, de 8-12 de fevereiro de 1949.

Frost e Krug (2), trabalhando com quimeras citológicas em *Citrus*, encontraram, no mínimo, três camadas geratrizes; só as duas primeiras entram na formação das folhas.

Dermen (1) verificou também três camadas histogênicas em macieiras.

Quanto ao cafeeiro, nada se sabe ainda a este respeito. O presente trabalho é o resultado dos estudos levados a efeito no sentido de verificar a primeira hipótese atrás citada, isto é, a existência ou não de quimera citológica. Essa pesquisa também contribuiria para o estudo das camadas histogênicas em *Coffea arabica*.

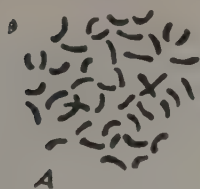
2—MATERIAL E MÉTODO

2.1—FÓLHAS

Gemas foliares e folhas novas foram colhidas e fixadas imediatamente de uma das seguintes formas: a) diretamente em "Craf" (6) durante vinte e quatro horas; b) prefixação em "Carnoy" (clorofórmio — três partes; álcool absoluto — duas partes; ácido acético glacial — uma parte), vinte e quatro horas e subsequente transferência para "Craf" por mais vinte e quatro horas. Após a fixação, o material foi lavado em álcool a 70%, procedendo-se em seguida à infiltração pela parafina, através de uma série com álcool butílico. Os cortes foram feitos com a espessura de 6 a 10 micra e a coloração pela hematoxilina de Heidenhain ou pelo violeta cristal. De folhas desenvolvidas da variedade *rugosa* e de uma planta da variedade *bourbon* foram também feitas lâminas para comparação de sua estrutura anatômica, sendo o material tratado da mesma forma anterior. As melhores lâminas foram obtidas com o material prefixado em "Carnoy" e colorido pela hematoxilina.

Além do método acima, utilizou-se ainda, para contagem de cromossomos, o da coloração rápida de folhas novas pelo método do carmim acético (5). O material foi colhido diretamente em "Carnoy", onde permaneceu durante algumas horas ou até o dia seguinte, sendo daí transferido para uma solução alcoólica de HCl a 17%, durante 4 minutos. O excesso de ácido foi retirado por uma rápida passagem em "Carnoy" e em seguida foi o material pôsto em novo recipiente com "Carnoy". As folhas foram retiradas uma a uma e colocadas numa gota de carmim acético sobre uma lâmina, que foi aquecida lentamente até o material tornar-se escuro. A seguir enxugou-se o material e a lâmina com um pedaço de papel chupão e adicionou-se novamente, à lâmina, uma gota de carmim. Depois de esmagar levemente a folha com uma agulha de ferro, foi colocada sobre ela uma lamínula. A lâmina de novo foi aquecida, fazendo-se pressão sobre a lamínula com uma rôlha, de modo que o tecido se desagregasse e as células se apresentassem numa só camada.

Se bem que tanto as preparações permanentes como as temporárias tivessem fornecido numerosas figuras, muito bem coloridas, as contagens dos cromossomos, em muitos casos, deram margem a dúvidas. Tentou-se



A — Metáfase em fôlha nova, célula da epiderme inferior, $2n = \pm 43$, hematoxilina, $\times 4\ 200$. B — Idem em célula da 3.^a camada após a epiderme inferior, $2n = \pm 45$, hematoxilina, $\times 4\ 200$. C — Metáfase em célula de fôlha nova, $2n = \pm 46$, nigrosina, $\times 2\ 140$. D — Idem, $2n = 44$, $\times 2\ 140$. E — Metáfase em ponto de raiz, $2n = 44$, hematoxilina, $\times 2\ 140$. F — Metáfase I em c.m.p. mostrando $22II$, $\times 2\ 800$. G — Metáfase em microsporo, $n = 22$, $\times 1\ 400$.

também um terceiro processo, recentemente descrito por Rosen (7), de coloração rápida dos cromossômios pela nigrosina. Boas preparações foram obtidas por este processo, porém não se pode dizer que as dúvidas surgidas nas contagens dos cromossômios tenham sido menores que em ambos os outros dois processos.

2.2—RAÍZES

Os atuais exemplares da variedade *rugosa* se acham enxertados sobre outra variedade de *Coffea arabica*. Para obtenção de raízes da haste, estacas foram tratadas com Rizopon B (Estimurhiz B) (3), tendo-se conseguido resultados satisfatórios. Tanto estas raízes como as das plantas obtidas por autofecundação, foram fixadas em "Craf", incluídas em parafina pelo método do álcool butílico, cortadas a 8 micra de espessura e coloridas pela hematoxilina férrica.

2.3—BOTÕES E FLORES

Para o estudo da meiose nas c.m.p. e da mitose nos grãos de pólen, foram colhidos botões, diariamente, durante muito tempo, em uma mistura de três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial. O material foi sempre conservado em refrigerador, somente sendo retirado para uma troca por fixador novo, vinte e quatro horas após a colheita e no momento do exame. As anteras foram coloridas pelo método usual do carmim acético.

Botões grandes foram protegidos com sacos de papel, para evitar contaminação por pólen estranho, por ocasião da abertura; quando as flores se abriram, uma parte foi conservada para estudo de autopolinização e outra foi colhida e levada para o laboratório. Prepararam-se lâminas com um filme de ágar a 0,5% e 15% de sacarose, semeando-se sobre elas o pólen. As lâminas foram conservadas em câmara úmida à temperatura ambiente. Quatro horas depois, já se podiam observar os grãos de pólen germinados. A contagem, porém, foi feita vinte e quatro horas depois.

Os desenhos foram feitos em câmara clara com os aumentos que vão especificados junto às figuras que ilustram o presente trabalho.

3—RESULTADOS OBTIDOS

3.1—ESTUDOS DAS FÓLHAS

Em células da epiderme, do mesófilo e das nervuras, puderam sempre ser verificadas metáfases somáticas com um número de cromossômios próximo de 44 (est. 1—A, B, C e D). Encontraram-se figuras com 42, 43, 44, 45, 46, 47 e 48 cromossômios, porém, apesar das numerosas lâminas examinadas, nunca foi possível confirmar essas contagens, sem deixar dúvidas. Deve-se levar em consideração que os cromossômios de *Coffea arabica* são muito pequenos, oferecendo sérias dificuldades o seu estudo em material impróprio, como uma folha em desenvolvimento.

Em cortes longitudinais e transversais de fôlhas do exemplar *rugosa* e do *bourbon* é difícil verificar qualquer diferença, quer no tamanho das células em geral, quer na organização das camadas e tecidos.

3.2—ESTUDO DAS RAÍZES

Tanto em raízes de estacas da planta *rugosa* (est. 1—*E*) como em raízes de plantas provenientes de sementes autofecundadas e não autofecundadas, determinou-se sempre $2n=44$ cromossômios, tendo sido as contagens realizadas em células de tôdas as camadas, desde a epiderme até o cilindro central.

3.3—MICROSPOROGÊNESE E ESTUDO DO PÓLEN

O exame do material colhido para êste estudo revelou, em metáfase I, 22 pares de cromossômios (est. 1—*F*). A distribuição dos cromossômios em anáfase I é normal, não se observando “laggards”. Em metáfase II, verificaram-se 22 cromossômios em cada um dos pólos.

Na primeira divisão somática, ocorrida no microsporo, contaram-se, também, $n=22$ cromossômios (est. 1—*G*). Quando semeado em lâmina preparada com ágar e sacarose, o pólen germina dentro de poucas horas. Depois de vinte e quatro horas, acharam-se 69% de germinação, percentagem essa normal, para *C. arabica*.

4—RESUMO E CONCLUSÕES

A ausência de plantas exatamente iguais ao *rugosa*, na descendência da planta estudada, sugeriu a hipótese de se tratar de uma quimera cromossômica. A rugosidade das fôlhas seria resultante da ocorrência de camadas de células de tamanhos diferentes, com números múltiplos de cromossômios, permanecendo tetraplóide a camada responsável pela formação dos gametas.

O exame de fôlhas novas, em crescimento, revelou que aí não ocorrem camadas com números múltiplos de cromossômios. As melhores contagens feitas mostraram, sempre, números muito próximos de 44 cromossômios.

Estudando-se a microsporogênese, verificou-se que os microsporocitos têm $2n=44$ cromossômios e que os grãos de pólen são formados através de um processo normal, apresentando $n=22$ cromossômios.

As raízes, tanto de estacas de hastes do cafeeiro original como de plantas descendentes dêsse cafeeiro, mostraram, também, que o tecido somático é inteiramente tetraplóide.

De acôrdo com êsses resultados obtidos, pode-se excluir a hipótese de que a planta *rugosa* seja uma quimera, com camadas de células com números múltiplos de cromossômios. Pode-se, igualmente, concluir que o cafeeiro é tetraplóide, tal como as demais variedades de *C. arabica*.

Resta, todavia, a possibilidade de ser o caráter *rugosa* devido a uma mutação gênica, ocorrida em uma ou mais camadas que afetam a fôlha, mas que não entram na formação das células reprodutoras. Esta hipótese, todavia, é difícil de ser posta à prova.

SUMMARY

The *Coffea arabica* L. variety *rugosa* has been characterized as having rugose or roughened leaves. However, progenies of this variety obtained from selfed and open pollinated flowers have not, as observed to date, produced plants with characteristic rugose or definitely roughened leaves. This lack of rugose leaves in the seedling progeny of the variety *rugosa* led to the present cytological investigation to determine whether rugose leaves might be due to differences in the polyploid nature of the component leaf layers.

Chromosome counts were made in cells of tissue obtained from root tips of seedlings and from root tips from stem cuttings, and from very young leaf buds. Chromosomes were also counted in the microsporocytes and in the microspores. The results of the cytological observations indicate that in the plant tissues examined there was an average number of 44 chromosomes.

The counting of chromosomes in the coffee leaf buds was difficult due to the small size of the chromosomes. Observations also showed that microsporogenesis in the variety *rugosa* was normal and that the microspores contained 22 chromosomes.

The results of this investigation show that *Coffea arabica* L. var. *rugosa* is a tetraploid plant, as are several other varieties of *C. arabica* that have been studied. The cytological observations also show that the rugose or rough condition of the leaves is not due to the presence of tissue layers of different polyploid nature.

LITERATURA CITADA

1. Dermen, Haig. Chimeral apple sports and their propagation through adventitious buds. *Jour. of Hered.* **39** : 235-242. 1948.
2. Frost, H. B. e C. A. Krug. Quimeras periclinais diplóides-tetraplóides surgidas em forma de variações somáticas em Citrus. *Bragantia* **4** : 449-474. 1944.
3. Inforzato, R. O emprêgo de hormônios no enraizamento de estacas de cafeeiro. *Bol. Super. Serv. Café do Estado de São Paulo* **21** : 288-293. 1946.
4. Krug, C. A., J. E. T. Mendes e A. Carvalho. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no E. de São Paulo. *Bol. Téc. do Instituto Agrônômico de Campinas* **62** : 9-57, fig. 1 — 122, est. I — LVIII. 1938.
5. Mendes, L. O. T. Investigações preliminares sobre a duplicação do número dos cromossômios da seringueira pela ação da colchicina. *Bol. Téc. do Instituto Agrônômico do Norte* **7** : 3-60. 1946.
6. Randolph, L. F. A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Techn.* **10** : 95-96. 1935.
7. Rosen, Gosta von. The rapid nigrosine-method for chromosome counts applicable to all the growing tissues of the plant. *Hereditas* **33** : 567-570. 1947.
8. Satina, S., A. F. Blakeslee and Amos F. Avery. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of by means of induced polyploidy in periclinial chimeras. *Am. Jour. of Bot.* **27** : 805-905. 1940.

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *DYSDERCUS*

CADEIAS DE CROMOSSÔMIOS EM TECIDO SOMÁTICO DE *DYSDERCUS*
MENDESI BLOETE (*HEMIPTERA-PYRRHOCORIDÆ*)⁽¹⁾

LUIZ O. T. MENDES⁽²⁾

Engenheiro agrônomo, Seção de Entomologia Aplicada, Instituto Agrônomo de Campinas

O macho de *Dysdercus mendesi* Bloete (1937) tem $2n = 16$ cromossômios, dos quais 14 são autossômios e 2 sexo-cromossômios (1, 2).

Em tecido embrionário, as células em prófase se prestam a observações sobre a morfologia dos cromossômios. A figura A da estampa 1 é uma fotografia de uma célula em prófase adiantada, em tecido embrionário masculino; a mesma célula foi fotografada após esmagamento do tecido, sob a lamínula, como se vê na est. 1—B. O cromossômio que falta na est. 1—B, onde somente se contam 15, é visto na est. 1—A, onde se acha assinalado.

Observa-se a existência de um par de autossômios, o maior do complemento, na forma de um longo bastonete, com uma grande constrição subterminal, vendo-se ainda, no seu maior braço, cinco outras constrições, bem distintas. Uma ampliação da est. 1—B é apresentada na est. 2, por onde se pode melhor observar a existência de constrições nos demais cromossômios, em alguns casos submedianamente dispostas, mas quase sempre com localização subterminal. Uma placa de cromossômios somáticos, em prometáfase, também de tecido embrionário, é apresentada na est. 5—C. Nela distingue-se, perfeitamente, o grande par de autossômios (que chamamos cromossômios I), com uma bem visível constrição subterminal. Já em metáfase, não temos podido distinguir tal constrição no cromossômio I, em virtude do seu estado de grande contração.

À vista disso, somos levados a concluir que, pelo menos nas figuras e fases por nós observadas, os cromossômios somáticos desta espécie de *Hemiptera* são normais. Não encontramos nenhum indício da existência de cromossômios dicêntricos em *D. mendesi*, em tecido somático.

Durante nossos estudos relativos à meiose no macho dessa espécie, nossa atenção foi despertada para o fato — bastante comum em *Hemiptera* — de serem observadas placas metafásicas espermatogoniais, onde os cromossômios aparecem ligados entre si, por finos conectivos fibrilares, aparen-

⁽¹⁾ Trabalho apresentado durante a "Segunda Semana de Genética", realizada em Piracicaba, em fevereiro de 1949.

⁽²⁾ O autor consigna seus agradecimentos ao Eng. Agr. A. J. T. Mendes, pelas sugestões apresentadas durante a preparação do manuscrito.

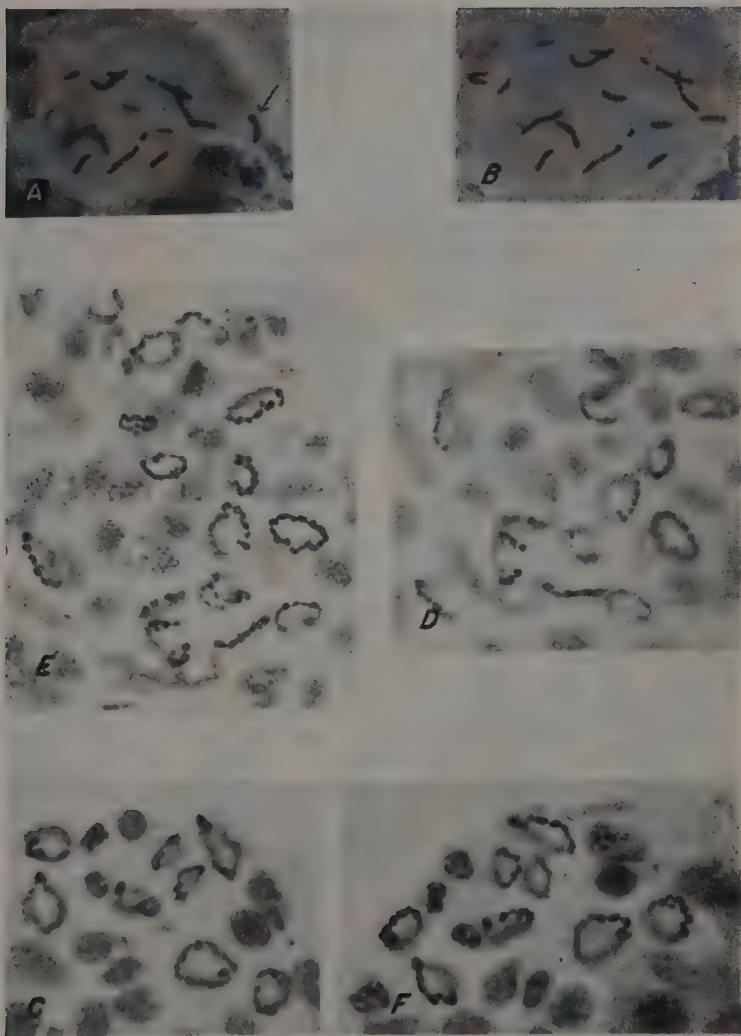
temente sem ordem alguma. Em certos cistos notam-se placas metafásicas onde os cromossômios são vistos todos livres e independentes (est. 5—*B*) pelo menos em sua aparência, enquanto em outros são vistos os mencionados conectivos (est. 5—*A*). Com a atenção voltada para os cromossômios espermatogoniais, em suas várias fases, tivemos oportunidade de encontrar, em uma preparação colorida comorceína acética, um cisto onde os cromossômios apareciam todos ligados, formando uma cadeia em forma de anel. Posteriormente, verificamos outros casos semelhantes, num dos quais notamos que em cinco, dos sete tubos testiculares, havia cistos com os cromossômios em cadeia anular.

Os cromossômios em metáfase (est. 1—*C* a *F*) apresentam-se bastante contraídos, e, por intermédio de curtos conectivos, ligados uns aos outros, pelas pontas, formando uma cadeia em forma de anel. Em certos casos, um ou dois cromossômios ficam localizados na parte interna do anel, mas sempre ligados a um ou dois cromossômios da cadeia, por conectivos também francamente visíveis. Em algumas células, o anel não é perfeitamente formado, vendo-se duas séries de cadeias, paralelamente dispostas: a externa, contendo maior número de cromossômios, formando um arco, e os cromossômios da cadeia interna, além de ligados uns aos outros pela forma descrita, ligados aos da cadeia externa por conectivos laterais.

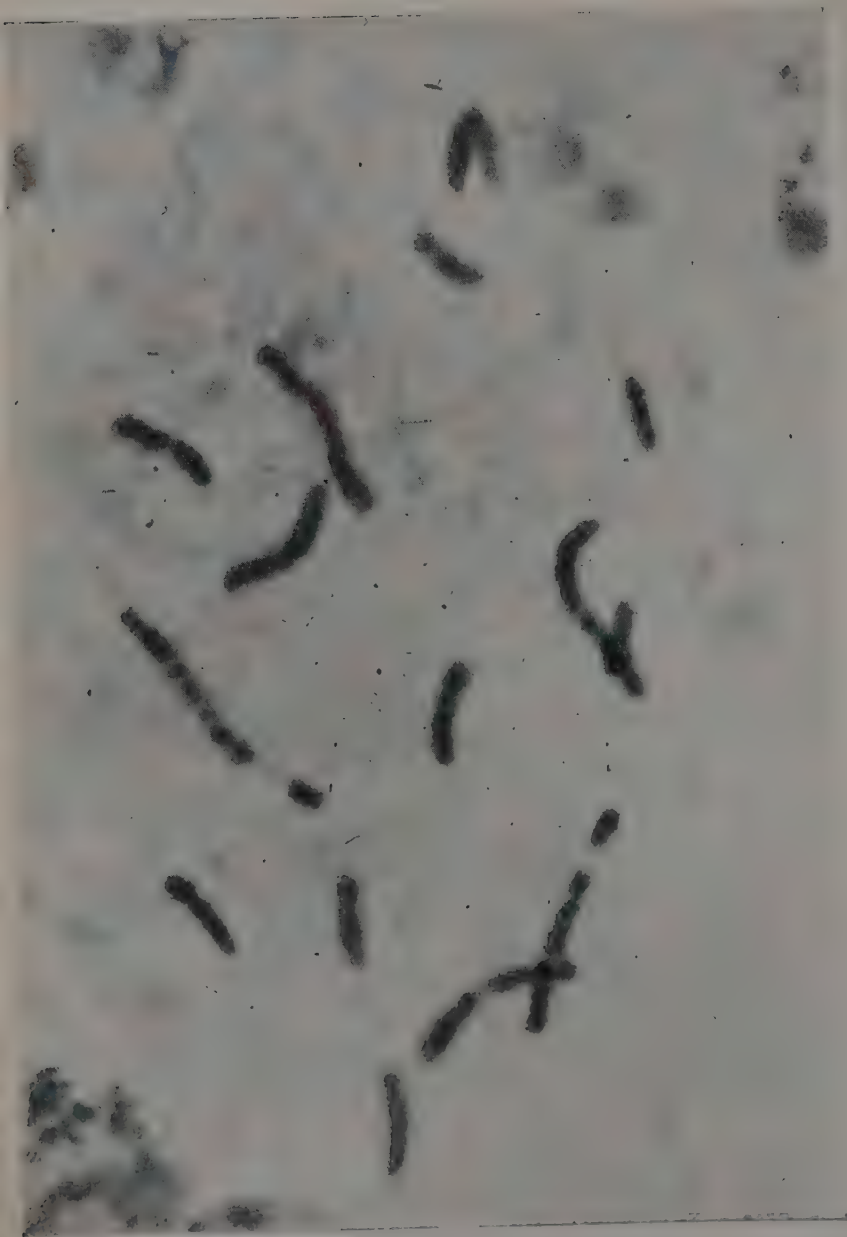
Ao iniciar-se a divisão, os cromossômios se fendem longitudinalmente (est. 3) e, ao caminharem para os pólos (est. 4), em virtude de ainda continuarem ligados entre si, apresentam-se formando dois anéis, menos espessos que o primitivo, cada um deles constituído por uma cadeia de cromossômios anafásicos. Em virtude de seu tamanho relativamente pequeno, não nos tem sido possível estudar a forma que eles assumem, em anáfase, mas, em alguns casos, nota-se facilmente que se acham encurvados, com ambas as pontas voltadas para o pólo que lhes fica mais próximo, como se nota na anáfase assinalada na est. 4.

Na est. 5—*D*, apresentamos um desenho, onde se vê um anel formado por 14 cromossômios, aparentemente ligados pelas pontas, tendo internamente dois cromossômios, também ligados à cadeia. Dois dos cromossômios do anel já se acham fendidos longitudinalmente. Na est. 5—*E*, observa-se uma cadeia em início de anáfase, notando-se francamente que os cromossômios se dividiram longitudinalmente, paralelamente ao equador, e estão encurvados, com suas pontas voltadas para o pólo para onde se dirigem. Na est. 5—*F*, é apresentada uma célula, onde se nota uma anáfase adiantada de cromossômios em cadeia; continuam ainda ligados entre si, e alguns deles com ambas as extremidades voltadas para o pólo.

A est. 5—*G* mostra um espermatogônio em prófase adiantada, onde os cromossômios se acham ligados por conectivos. A maioria dos conectivos se acha ligada às extremidades dos cromossômios, mas, em alguns casos, notam-se êsses conectivos ligados a outros pontos do corpo do cromossômio. Aparentemente, se tal célula continuasse sua evolução, formar-se-ia uma placa metafásica com os cromossômios em cadeia anular,



Celulas de tecido embrionário e do espermatogônio de *Dysdercus mendesi*. 1 000 \times . A — Profase em embrião; achase assinalado o cromossômio que se perde posteriormente (B), com o esmagamento do tecido sob a laminula. B — A mesma célula apresentada em A, após o esmagamento do tecido. C a F — Espermatogônios com cromossômios em cadeia anular.



Prófase em tecido do embrião. Ampliação da figura B da estampa 1. Contam-se somente quinze cromossômios, pelo fato de se ter perdido um deles, com o esmagamento do tecido. 4 350 X.

contendo, na sua face interna, três ou quatro cromossômios, com conectivos laterais ou distais ligando-os aos da cadeia externa.

Não temos elementos para tentar explicar a razão de ser da existência de conectivos, ligando cromossômios somáticos, em prófase, metáfase e anáfase. Entretanto, tal fato talvez possa servir de elemento à elucidação da forma tomada por certos cromossômios, em anáfase somática, isto é, parece-nos possível explicar o fato de serem vistos cromossômios anafásicos, com ambas as pontas voltadas para o pólo, sem a necessidade de se recorrer à teoria da existência de ponto de inserção difuso, ou de cromossômios com dois pontos de inserção. Não vamos aqui discutir o que se tem escrito sobre o assunto; pretendemos unicamente tentar dar uma explicação ao fato por nós observado.

Pelos estudos feitos em figuras meióticas, parece que, se se admitir a existência de centrômero localizado, nos cromossômios de *D. mendesi*, se acha êle praticamente numa extremidade. Por outro lado, por observações feitas em figuras anafásicas somáticas, em virtude da curvatura assumida por certos cromossômios, com suas extremidades voltadas para o pólo para onde se dirigem, parece que existem dois centrômeros, um em cada extremidade dos cromossômios. Entretanto, as figuras apresentadas demonstram que não podemos admitir a existência de cromossômios simétricos, ou cromossômios dicêntricos, dada a evidente assimetria mostrada pelo seu estudo morfológico, principalmente no que se refere ao cromossômio I. Difícil também seria aceitar-se a idéia de ponto de inserção difuso, à vista da mesma argumentação.

Ora, as evidências são contra a aceitação da teoria que admite a existência de dois centrômeros nos cromossômios dessa espécie, apesar de, em tecido somático, alguns cromossômios em anáfase se comportarem como se tivessem realmente dois centrômeros.

O fato, já atrás comprovado, de existirem finos conectivos, ligando os cromossômios em metáfase e anáfase, nos leva a lançar uma nova hipótese sobre o assunto. Não cremos que possa ser generalizada, mas pode perfeitamente explicar as configurações por nós observadas em *D. mendesi*. Isto é, dada a existência de conectivos (podemos admitir que nem sempre tais conectivos são visíveis, como acontece também com as fibrilas do fuso, que muitas vezes não são vistas), podemos explicar o motivo pelo qual cromossômios somáticos, providos de um único centrômero, em anáfase, se curvam para os pólos, como se tivessem dois centrômeros.

Se três cromossômios, com seu eixo longitudinal disposto paralelamente ao equador (como acontece em *Hemiptera*), se acharem ligados pelas pontas, e os conectivos permanecerem durante a anáfase, o cromossômio central tomará uma série de configurações, dependendo sua forma da localização do seu próprio centrômero e da do centrômero nos outros dois cromossômios a êle ligados. Sempre que êle tiver um centrômero subterminal, encurvar-se-á para o pólo, como se fôsse provido de dois centrômeros, qualquer que seja a localização dos centrômeros dos dois cromossômios contíguos. A curvatura de uma extremidade será devida à dinâmica de seu próprio

centrômero, enquanto a da outra será consequência da dinâmica do centrômero localizado no cromossômio que se acha ligado a essa outra extremidade. Uma cadeia de cromossômios se comportará como se se tratasse de um único cromossômio, muito longo, com vários centrômeros ativos. Dessa maneira, a extremidade do cromossômio, mais afastada do centrômero, ficará tanto menos encurvada para o pólo, e tanto mais para trás, em relação à extremidade mais próxima do centrômero, quanto mais longo fôr o conectivo que a ligue ao cromossômio vizinho, e quanto maior fôr a distância que a separe do centrômero desse mesmo cromossômio vizinho.

Como observamos na estampa 2, a maioria dos cromossômios somáticos de *D. mendesi* apresenta uma bem visível constrição subterminal. Admitindo-se que tal constrição seja a constrição cêntrica ou primária (centrômero), e aceitando-se o fato de os cromossômios somáticos se acharem ligados por conectivos, fica demonstrado que, em anáfase, quase todos os cromossômios poderão apresentar-se encurvados, com suas pontas voltadas para o pólo, apesar de serem providos de um único centrômero.

CONCLUSÃO

Pela morfologia dos cromossômios somáticos de *D. mendesi*, o autor é levado a admitir que êles são normais. As evidências morfológicas são a favor da existência de um centrômero em cada cromossômio, na maioria das vêzes com localização subterminal. Considerando a existência de conectivos — que ligam os cromossômios somáticos, em prófase, metáfase e anáfase — o autor demonstra que a simples verificação e aceitação desse fato é suficiente para explicar a razão por que, em anáfase, são vistos cromossômios somáticos, aparentemente providos de um único centrômero, encurvados e com as pontas voltadas para o pólo, como se tivessem dois centrômeros.

SUMMARY

The male of *Dysdercus mendesi* Bloete (1937) has $2n=16$ chromosomes: 14 autosomes and 2 sex-chromosomes. Details are presented on the morphology of these chromosomes of the somatic cells of embryonic tissue. The long pair of rod shaped chromosomes is the longest of the set, and they show a conspicuous sub-terminal constriction (supposed to be the centromere) and five other smaller constrictions. In most of the other chromosomes sub-terminally localized constriction (supposed also to be the centromere) can also be observed. Based on these observations it has been concluded that the chromosomes of *D. mendesi* are morphologically normal. Dicentric chromosomes in the somatic tissue of this species are absent and the hypothesis of existence of diffuse centromere is also excluded. All of the chromosomes appear to have a definitive localized centromere.

Metaphase spermatogonial plates have been observed where all the chromosomes appear as short and thick rods, apparently attached end-to-end, by definite connections, and forming a ring-shaped chain. Sometimes one or two chromosomes were found inside a ring formed by the others, but always connected to one or two of the chromosomes of the ring. Chromosomes chains of varied shapes were also found in the metaphase plates.

In anaphase the longitudinally split chromosomes of the rings attain a curved shape as they move to the poles, giving the impression that both their extremities are pulled to the poles.

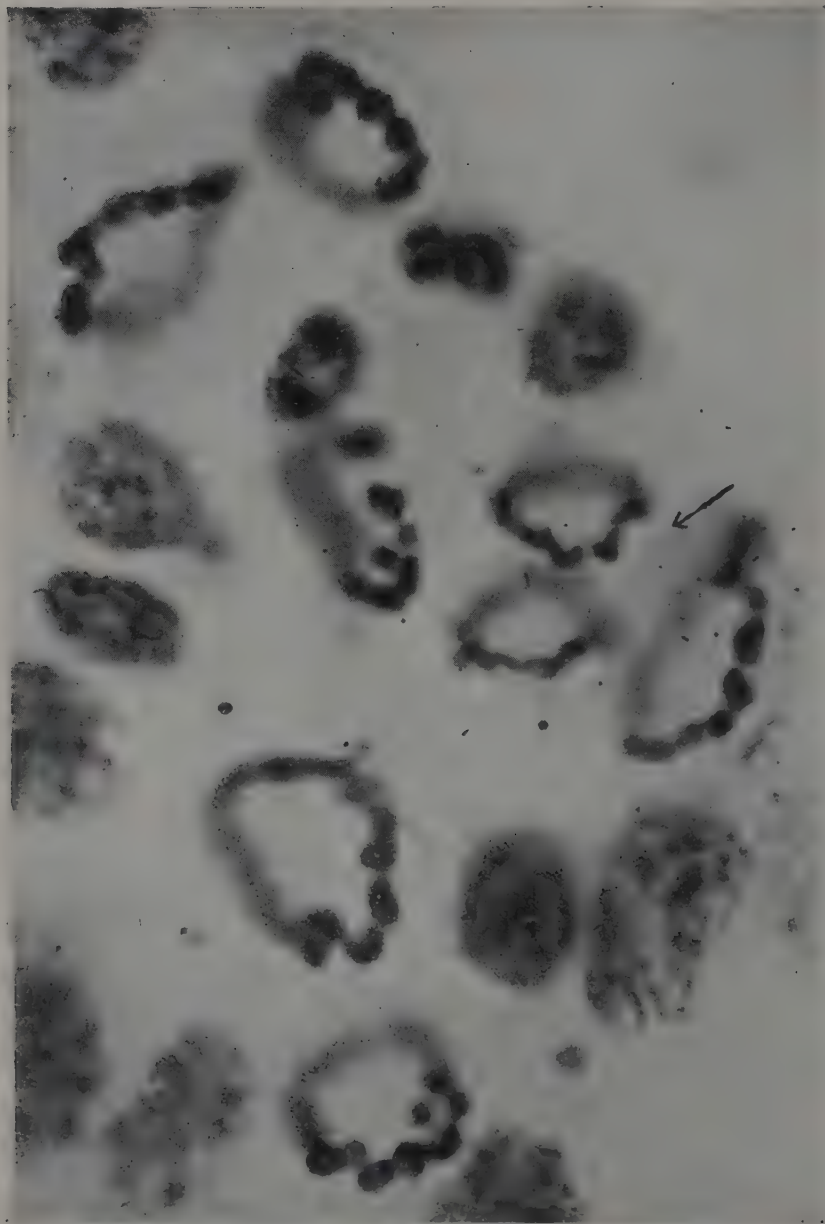
A new hypothesis is presented to explain why the normal chromosomes of *D. mendesi*, provided with one localized centromere, can attain the curved shape observed in the anaphase configurations. It is based on the existence of connections attaching the chromosomes by their extremities, from metaphase until anaphase, and giving origin to the chain configuration already mentioned. These chains of chromosomes behave in anaphase as one rather long chromosomes with several centromeres. The centromeres are pulled to the poles, but as the extremities of the chromosomes of the chain are attached to each other, they give the false impression that both extremities of the chromosomes are being pulled to the poles, as if the chromosomes were provided with two centromeres, or as if there were diffuse centromeres.

LITERATURA CITADA

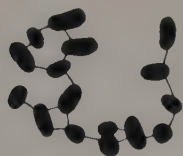
1. Mendes, Luiz O. T. Sobre a meiose de *Dysdercus mendesi* Bloete (1937) *Hemiptera-Pyrrhocoridae*. *Bragantia* 7 : 243-256, est. 1-5, 1947.
2. Piza Jr., S. de Toledo. Cromossômios de *Dysdercus* (*Hemiptera-Pyrrhocoridae*). An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" (Piracicaba) 4 : 209-216, fig. 1-14, 1947.



Espermatogônios com cromossômios em cadeia anular. Em algumas células os cromossômios já se acham fendidos longitudinalmente. 3 800 \times .



Espermatogônios com cromossômios em cadeia anular. Acha-se assinalada uma célula em anáfase adiantada, onde se nota que os cromossômios caminham para os polos ainda ligados entre si, alguns deles encurvados e com suas extremidades voltadas para o pólo para onde se dirigem. 3 800 X.



A



B



C



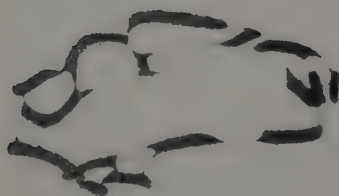
D



E



F



G

Cromossomos de células do espermatogônio e de tecido de embrião. A — Metáfase espermatogonial; os cromossomos acham-se ligados. 2 500 \times . B — Metáfase espermatogonial; os cromossomos acham-se livres. 2 500 \times . C — Prometáfase em embrião. 2 500 \times . D — Espermatogônio com cromossomos em cadeia anular. 2 500 \times . E — Anáfase de cromossomos em cadeia anular. 3 000 \times . F — Idem. 2 500 \times . G — Prófase em espermatogônio; os cromossomos acham-se ligados por conectivos. 2 500 \times .

INVESTIGAÇÕES SÔBRE A TRISTEZA DOS *CITRUS*

II — CONCEITOS E DADOS SÔBRE A REAÇÃO DAS PLANTAS CÍTRICAS À TRISTEZA ⁽¹⁾

A. S. COSTA, *engenheiro agrônomo da Secção de Genética, Instituto Agronômico de Campinas;*
T. J. GRANT, *patologista do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e adido agrícola da Embaixada norte-americana, e S. MOREIRA, engenheiro agrônomo da Subdivisão de Horticultura, Instituto Agronômico de Campinas.*

1—INTRODUÇÃO

Os estudos sôbre a tristeza e moléstias afins das plantas cítricas receberam grande impulso nos últimos anos. Isto foi o resultado da grande importância econômica alcançada por êste grupo de moléstias e evidenciada pelos resultados desastrosos que se seguiram ao seu aparecimento em novas áreas, onde as plantas cítricas eram cultivadas principalmente sôbre cavalos de laranja azêda (*Citrus aurantium* L.).

Desde que foram primeiramente observadas, notou-se que estas moléstias causavam perdas, principalmente em certas combinações de cavalo-cavaleiro, das quais a combinação laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) sôbre laranja azêda tem sido a mais bem estudada. Em contraste, plantas de laranja doce enxertadas sôbre cavalos de laranja doce, sôbre limão cravo (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle ou, possivelmente, um híbrido de tangerina, *C. reticulata* Blanco x *C. aurantifolia*) e sôbre alguns outros cavalos, bem como plantas de pé franco de laranja doce e de outros tipos eram consideradas como sendo resistentes à moléstia.

Sabe-se agora que danos bastante severos podem ser causados pela tristeza a muitas combinações de cavalo-cavaleiro (4, 7), nas quais outros cavalos, que não a laranja azêda, foram usados. Até mesmo plantas de pé franco de certos tipos de *Citrus* podem mostrar-se afetadas pela tristeza, em graus variáveis, chegando a injúria apresentada a igualar, em muitos casos, a observada em combinações de doce sôbre azêda.

Um plano de cooperação entre o Instituto Agronômico e o Departamento Federal de Agricultura dos Estados Unidos, para o estudo da tristeza, está em andamento nesta Instituição, desde 1946. Os trabalhos foram iniciados por C. W. Bennett e A. S. Costa e estão atualmente a cargo dos autores. Êstes trabalhos constam do estudo da tristeza em seus diversos aspectos, como a relação da moléstia para com o vetor, possíveis plantas hospedeiras, métodos de contrôle e, principalmente, a determinação da reação de mais de trezentas variedades e espécies de *Citrus* à tristeza. Cada

⁽¹⁾ Segunda publicação de uma 2.^a série de trabalhos sôbre a tristeza, feitos em cooperação entre o Instituto Agronômico de Campinas e o U. S. Department of Agriculture. Veja também citações 3, 4 e 7 na literatura citada.

um destes tipos está sendo estudado como cavalo para variedades comerciais de *Citrus*, como cavaleiro sobre laranja azêda e também em sua reação de pé franco à moléstia. Os resultados parciais dos trabalhos efetuados já foram publicados (3, 4, 7).

2—REAÇÃO DAS PLANTAS CÍTRICAS À TRISTEZA

Fatores inerentes à própria planta são os principais responsáveis pela reação dos diferentes tipos de *Citrus* à tristeza, embora certas condições do ambiente também influenciem a maneira da reação. A êste respeito tem-se notado principalmente que a manifestação dos sintomas de tristeza em plantas inoculadas da combinação doce sobre azêda é bastante retardada durante o inverno, necessitando-se três ou mais meses para que os sintomas apareçam, ao passo que nas épocas quentes é comum mostrarem as plantas inoculadas os sintomas em metade do tempo. A quantidade de água no solo pode apressar ou retardar a manifestação dos sintomas, e a luz parece também ter certa influência.

Entre os característicos mais importantes da planta, que parecem governar a sua reação à tristeza, podem ser citados: a) A idade da planta; b) A resistência da planta; c) A capacidade da planta em permitir a multiplicação do vírus; d) A resistência dos tecidos da planta, e especialmente do floema, ao princípio que causa injúria.

Está claro que no caso da reação de plantas enxertadas há uma interação entre os característicos de cada um dos componentes, principalmente entre a concentração que o vírus ou princípio tóxico pode atingir no cavaleiro ou no ponto de união entre ambos os componentes, e a sensibilidade ou tolerância dos tecidos de cada um ao princípio tóxico.

Sendo a reação à tristeza resultante de fatores que podem variar independentemente, é de se esperar a existência de um gradiente na reação manifestada pelas diferentes combinações de enxertia e também nas diferentes espécies, de pé franco.

2.1—IDADE DA PLANTA

Os resultados obtidos em muitos ensaios de inoculação parecem indicar que as plantas novas de laranja doce sobre azêda mostram sintomas de infecção mais rapidamente que plantas mais idosas. Tem também sido observado que é mais fácil infectar mudinhas novas do que plantas mais desenvolvidas dos tipos que mostram sintomas de pé franco. É possível que isto esteja ligado ao maior vigor vegetativo de plantas novas, que permite ao vírus atingir maior concentração nos tecidos; poderia ainda resultar da menor quantidade de tecidos condutores possuída pela planta jovem, mais rapidamente prejudicados, ou pela maior facilidade com que o vetor é estabelecido nestas.

2.2—RESISTÊNCIA DA PLANTA

Existe bastante variação na resistência à tristeza entre as diferentes espécies do gênero *Citrus*, entre variedades de uma mesma espécie e mesmo entre clones da mesma variedade.

Alguns tipos de *Citrus* parecem possuir certa resistência à moléstia sob condições naturais, mas uma vez infectados mostram os sintomas usuais da moléstia quando enxertados em cavalos não tolerantes. Tal é o que acontece com alguns "grapefruits" (*Citrus paradisi* Macf.) e algumas tangerinas. Plantas destes tipos, enxertadas sobre cavalo de azêda, crescendo nas proximidades de laranjais de doce sobre azêda, demoram mais tempo para mostrar sintomas do que plantas desta última combinação e, no caso dos "grapefruits", o declínio da planta é mais lento. Camp (6) relata que também na Argentina as plantas de mandarinas enxertadas sobre cavalos de azêda demoraram mais para mostrar os sintomas que plantas comparáveis de doce sobre azêda.

A resistência da planta à infecção, sob condições naturais, pode ser devida a dois fatores principais, agindo isolada ou conjuntamente: a) Resistência à infecção pelo vetor; b) Resistência fisiológica.

A resistência à infecção pelo pulgão preto da laranjeira (*Aphis citricidus* Kirk = *A. tavaresi* Del Guercio) foi notada particularmente para a laranja azêda, mas é provável que exista também para alguns limões (*Citrus limon* (L.) Burn, f.), mandarinas, "grapefruits" e, possivelmente, outros tipos. Tem sido notado que é muito difícil inocular com sucesso plantinhas de laranja azêda, por meio do vetor, enquanto que por meio de união de tecidos a percentagem de infecção é relativamente maior. Em uma experiência inocularam-se mudinhas de laranja azêda, comparativamente, com o vetor virulífero e por enxertia. De 25 plantas inoculadas com os afídeos pôde-se recobrar o vírus de apenas 4, enquanto que de 28 plantas inoculadas por enxertia, o vírus foi recobrado de 18. Em outra experiência, prepararam-se 30 plantinhas com copa mista, composta de um galho de laranja azêda e de um galho de laranja doce, sobre cavalo de azêda. Estas foram separadas em três grupos de 10 plantas e inoculadas duas vezes com o vetor virulífero, da seguinte maneira: num grupo, os afídeos⁽¹⁾ foram colocados sobre o galho da copa de laranja azêda; no outro grupo, os afídeos foram colocados sobre o galho de doce; outro grupo não foi inoculado. Das 10 plantas inoculadas nos galhos de laranja doce, 7 mostraram logo sintomas de infecção na parte inoculada, sendo que, destas, 6 plantas também mostraram sintomas nos galhos de azêda. Das 10 plantas inoculadas na parte azêda, somente uma mostrou sintomas no galho de azêda e também no galho de doce, mas muito tempo mais tarde, isto é, cerca de doze meses após a inoculação. As 10 plantas usadas como testemunhas permaneceram sadias.

Duas hipóteses parecem mais prováveis para explicar a resistência da laranja azêda à infecção: a) A maneira de alimentação do vetor nesta planta talvez evite a introdução do vírus no tipo de tecido necessário para que haja multiplicação; b) A existência de princípios, nas folhas de laranja azêda, que inibem o vírus.

A observação de plantas no campo parece indicar que o pulgão preto da laranjeira prefere as laranjas doces às laranjas azêdas, mas este fato

(1) Os afídeos foram encerrados em um saco de papel colocado sobre o galho que se queria inocular, a fim de evitar que passassem ao outro galho.

unicamente não poderia explicar a resistência da laranja azêda à inoculação. Além disso, têm sido observados casos de grande infestação da laranja azêda pelo mesmo inseto.

Schultz e outros (12), em estudos sobre a resistência de variedades de batata (*Solanum tuberosum* L.) ao vírus A, também verificaram que existiam tipos imunes ao vírus, por meio de inoculação com afídeos, mas suscetíveis à inoculação por enxertia.

Além da maior dificuldade em obter infecção da laranja azêda por meio do vetor, em comparação com enxertia, notou-se, também, em numerosas experiências, que não tem sido possível recobrar o vírus da tristeza por meio do vetor, de plantas de laranja azêda afetadas. Isto, entretanto, tem sido conseguido com relativa facilidade por enxertia.

Existe bastante variação na resistência fisiológica dos diferentes tipos de *Citrus* à tristeza, a julgar pela maior ou menor severidade dos sintomas que apresentam quando enxertados sobre laranjas azêdas ou outros cavalos não tolerantes. Até clones da mesma variedade podem diferir em sua resistência, conforme foi observado na Estação Experimental de Limeira. Neste local, clones da variedade Pêra, enxertados em laranja azêda, mostraram 100% de infecção. No caso de alguns clones, as plantas decaíram rapidamente e morreram em poucos anos, ao passo que as copas de outros clones permaneceram vivas, não obstante a folhagem ser esparsa e mais ou menos doentia. Embora estas reações não representem completa resistência à moléstia, indicam, entretanto, que há gradação na formação de vírus ou princípio tóxico, até entre os clones de uma mesma variedade.

Nos quadros 1 e 2 estão reproduzidos os resultados médios obtidos em estudos minuciosos efetuados em Campinas sobre a infecção e a reação de uma variada coleção de espécies e variedades do gênero *Citrus*, enxertadas sobre variedades de laranja azêda. Na discussão da reação destes tipos é preciso ser levado em consideração que o conceito de resistência à tristeza de uma variedade, quando enxertada sobre laranja azêda ou cavalo do mesmo tipo, não deve ser confundido com o conceito de tolerância da mesma variedade, quando usada como cavalo para laranjas doces ou tipos semelhantes. O conceito de tolerância será melhor explicado mais adiante.

A observação dos dados dos quadros 1 e 2 mostra que há bastante variação no comportamento dos diferentes grupos, embora haja também variação dentro dos grupos. De uma maneira geral, pode-se notar que há uma correlação entre a percentagem média de infecção obtida nas inoculações e o grau médio de severidade dos sintomas. É aparente que os tipos que apresentaram sintomas mais severos foram os que se mostraram mais suscetíveis à infecção. Parece constituir exceção o grupo das mandarinas que, não obstante apresentar sintomas relativamente severos, se mostrou menos suscetível à infecção.

As laranjas doces se mostraram mais suscetíveis à infecção e apresentaram sintomas mais severos que os representantes de todos os outros grupos. A variedade Barão mostrou-se mais suscetível que a Valência e apre-

sentou sintomas bastante severos, confirmando observações anteriores de que era muito suscetível à tristeza.

As mandarinas parecem possuir certa resistência à infecção, mas, quando afetadas, mostram sintomas severos. Os "grapefruits" são mais resistentes à infecção que as laranjas doces e mostram sintomas mais moderados. O "grapefruit" Leonardy mostrou-se mais suscetível que o Duncan, com sintomas mais severos. Bennett e Costa (4) atribuíram o fato de os "grapefruits" mostrarem sintomas menos severos, quando enxertados sobre azêda, à menor capacidade desses tipos em permitir multiplicação do vírus.

Os tângelos (*Citrus reticulata* x *C. paradisi*) foram incluídos no quadro em dois grupos, de acordo com o seu procedimento como cavalo. Os tângelos tolerantes, quando enxertados sobre azêda, se comportam aproximadamente como as laranjas doces, mostrando sintomas mais severos e sendo mais facilmente infectados que as tangerinas. Os tângelos não tolerantes se comportam da mesma maneira que os "grapefruits".

O comportamento dos "citranges" (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus sinensis*) foi também variado. Alguns se mostraram suscetíveis à infecção e apresentaram sintomas moderadamente severos. Outros "citranges", assim como os "citrumeiros" (*P. trifoliata* x *C. paradisi*), se comportam como *P. trifoliata*, mostrando-se resistentes à infecção.

As toranjas e zamboas, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, são, em geral, bastante resistentes à infecção, e mostram sintomas menos severos que os outros tipos. A laranja azêda também reage de maneira mais ou menos semelhante.

QUADRO 1.—Resultados médios de três inoculações de representantes de vários grupos de *Citrus* enxertados sobre laranja azêda, com o vírus da tristeza, por meio do vetor.

Grupo	Plantas inoculadas	Plantas infectadas após três inoculações	Porcentagem de infecção	Grau médio ⁽¹⁾ dos sintomas	Porcentagem ⁽²⁾ de infecção de cada inoculação			
					1.ª	2.ª	3.ª	Média
	N.º	N.º	%		%	%	%	%
Laranjas doces	48	48	100	4,5	83	75	100	86
Mandarinas	96	86	90	4,1	45	59	54	53
Tângelos (tolerantes)	100	95	95	4,6	57	72	58	62
Tângelos (não tolerantes)	30	28	93	3,7	40	56	75	57
"Grapefruits"	20	19	95	3,7	56	33	83	57
"Citranges" (suscetíveis)	15	14	93	3,0	53	43	75	57
Toranjas e zamboas	54	20	37	2,5	2	11	26	13
Laranjas azêdas	66	10	15	2,4	0	2	14	5
"Citranges" (resistentes)	15	0	0	0	0	0	0	0
"Citrumeiros"	40	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. trifoliata</i>	15	0	0	0	0	0	0	0

(¹) O grau dos sintomas varia de 0 a 5, sendo dado subjetivamente, de acordo com a sua severidade. Grau 0 corresponde à ausência de sintomas; grau 5 a sintomas bastante severos, com amarelamento muito forte, queda das folhas, etc. Os graus intermediários, para sintomas intermediários.

(²) Porcentagem sobre o número de plantas que não foram infectadas nas inoculações anteriores.

QUADRO 2.—Resultados médios das inoculações de duas variedades de laranja doce e duas de “grapefruit”, enxertadas em quinze variedades diferentes de laranja azêda, com o vírus da tristeza, por meio do vetor.

Variedade	Plantas inoculadas	Plantas infectadas após três inoculações	Porcentagem de infecção	Grau médio dos sintomas	Porcentagem de infecção de cada inoculação			
					1.ª	2.ª	3.ª	Média
	N.º	N.º	%		%	%	%	%
Barão A	75	73	97	4,8	70	77	...	74
Valência	75	68	90	4,6	50	50	40	47
“Grapefruit” Leonardy	62	50	81	4,0	47	27	54	43
“Grapefruit” Duncan	57	42	74	3,5	31	12	47	30

2.3 CAPACIDADE DA PLANTA EM PERMITIR MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS

Os tipos de *Citrus* estudados variam na sua capacidade em permitir a multiplicação do vírus da tristeza em seus tecidos, podendo-se enquadrar em três grupos : a) Aquêles nos quais o vírus parece atingir concentração elevada ; b) Tipos nos quais o vírus só atinge concentrações moderadas ; c) Tipos nos quais o vírus não parece capaz de se multiplicar.

Devido à inexistência, até o presente momento, de um método que permita a determinação direta da concentração do vírus da tristeza nas diferentes plantas, tem-se lançado mão do “teste da laranja azêda” (7). Êste é feito enxertando-se o tipo que se quer estudar sobre cavalo de azêda e inoculando-se o enxerto e admitindo-se que a severidade dos sintomas apresentados pelas plantas inoculadas é proporcional à concentração que o vírus ou princípio tóxico resultante da presença do vírus nelas atinge. A capacidade da planta em permitir, ou não, a multiplicação do vírus, tem sido determinada pela inoculação do tipo a ser estudado com o vetor ou pela união de tecidos e posterior recuperação do vírus para plantas-teste de doce sobre azêda.

2.4 TOLERÂNCIA DOS TECIDOS DA PLANTA E ESPECIALMENTE DO FLOEMA AO PRINCÍPIO QUE CAUSA INJÚRIA

A tolerância ou sensibilidade dos tecidos, e principalmente do floema ao princípio que causa injúria, tem sido estudada usando-se os diferentes tipos como cavalos para tipos nos quais se sabe que o vírus ou princípio tóxico atinge concentrações mais ou menos elevadas. Se os sintomas apresentados pelo enxerto forem severos, os tecidos do cavalo são considerados sensíveis, ao passo que, se os enxertos não apresentarem sintomas, os tecidos

do tipo usado como cavalo serão considerados tolerantes. Quanto a estes característicos, os tipos de *Citrus* estudados podem ser classificados em três grupos: a) Bastante sensíveis; b) Moderadamente sensíveis; c) Tolerantes.

Baseados nos conceitos atrás emitidos sobre a multiplicação do vírus, tolerância dos tecidos ao princípio tóxico e reação observada de várias combinações de cavalo-cavaleiro, Bennett e Costa (4) sugeriram que as variedades e espécies cítricas podem ser classificadas em cinco grupos principais quanto à sua relação para com o vírus da tristeza. Resultados adicionais sobre a reação de numerosas combinações entre cavalo-cavaleiro foram publicados posteriormente (7). Em geral, estes dados confirmam a existência dos grupos apontados por aqueles autores, embora tenha sido reconhecido que a inclusão de certos tipos nesses grupos deva ser alterada. Os cinco grupos principais, indicados por Bennett e Costa, são:

Grupo 1 — A multiplicação do vírus na planta é nula ou muito pequena, mas os tecidos do floema são bastante sensíveis ao vírus ou toxina. Aquêles autores (4) incluíram neste grupo a laranja azêda, alguns limões verdadeiros e o tângelo Sampson.

Os resultados das experiências mais recentes têm mostrado que neste grupo, chamado "grupo da azêda", podem ser incluídos ainda outros tipos como a espécie *Severinia buxifolia* (Poir) Tenore, alguns híbridos de *Fortunella*, como os denominados "kumquat" Meiwa e "kumquat" Nippon. A inclusão do tângelo Sampson nesta classe, feita por Bennett e Costa (4), tinha sido baseada nas informações procedentes da África (8), de que este tângelo, quando usado como cavalo, se comportava como a laranja azêda, complementadas com observações feitas na Estação Experimental de Limeira, onde plantas de um tângelo, que se supunha ser Sampson, enxertadas sobre laranja azêda, se mostraram resistentes à moléstia. As observações mais recentes sobre os vários tângelos, entre os quais o tângelo Sampson (7), têm mostrado que eles se comportam de duas maneiras diferentes, mas nenhum deles pode ser incluído nesta categoria. Algumas toranjas e zambosas podem ser também incluídas neste grupo.

Grupo 2 — A planta pode permitir a formação de concentrações moderadas de vírus ou toxinas e possuir floema moderadamente tolerante à injúria. A este grupo parecem pertencer algumas toranjas e zambosas e algumas limas. São tipos que, enxertados sobre azêda, mostram sintomas de tristeza; quando usados como cavalo para laranja doce ou outros tipos no qual o vírus atinge concentrações mais elevadas, há também manifestação do sintoma. Bennett e Costa (4) incluíram os "grapefruits" neste grupo. Embora seja possível que alguns deles possam ser aqui incluídos, parece que a maioria dos que têm sido ensaiados pertence ao grupo 5 daqueles autores. Na verdade, não existe uma diferenciação nítida entre os representantes deste e aquêles do grupo 5, adiante descrito.

Grupo 3 — A planta pode permitir a produção de concentrações médias ou elevadas de vírus ou toxinas e possuir floema bastante tolerante à injúria. A este grupo pertencem as laranjas doces, as mandarinas e tangerinas, alguns tângelos, alguns híbridos de *Poncirus trifoliata*, alguns

limões, etc. Os representantes dêste grupo, quando enxertados sôbre laranja azêda ou sôbre cavalos que pertençam aos grupos 1, 2 e 5, mostram sintomas de tristeza. De outro lado, os tipos dêste grupo podem ser usados como cavalos para enxertos de qualquer outro tipo. Quando enxertados com representantes da classe 5, pode haver manifestação de tristeza na copa.

Grupo 4 — A planta pode permitir pouca ou nenhuma multiplicação do vírus, mas possuir floema tolerante a concentrações elevadas de vírus ou toxinas. A êste grupo pertencem *Poncirus trifoliata* e alguns dos seus híbridos. Os representantes dêste grupo não mostram sintomas quando enxertados sôbre laranja azêda ou outros cavalos não tolerantes, mesmo quando inoculados repetidas vêzes ou expostos à infecção pelo vírus da tristeza. Inúmeras tentativas têm sido feitas para recobrar o vírus de plantas dêste grupo, que foram inoculadas várias vêzes, mas nenhum sucesso foi obtido.

As plantas de *P. trifoliata* e alguns de seus híbridos, que pertencem ao presente grupo, comportam-se como cavalos tolerantes e podem ser usados como cavalos para outros tipos de *Citrus*. Quando enxertados com representantes da classe 5, pode haver manifestação de sintomas na copa.

Grupo 5 — A planta pode permitir a produção de concentrações relativamente elevadas de vírus ou toxinas e possuir floema sensível à injúria. A êste grupo pertencem as plantas cujo característico principal é mostrar sintomas de pé franco, incluindo algumas limas (Kirk, Beledy), alguns "grapefruits" (Leonardy, Mexican, Duncan, etc.) e alguns limões.

3—NATUREZA DA INJÚRIA CAUSADA PELA TRISTEZA

Toxopeus (13) foi talvez o primeiro autor que procurou explicar a natureza da injúria causada por uma moléstia semelhante à tristeza, que ocorre em Java. Ele concluiu, de suas experiências de enxertia e interenxertia com cidra japonesa, laranja doce e laranja azêda, que o cavaleiro provavelmente tinha uma ação letal sôbre o cavalo, principiando esta ação quando o cavaleiro iniciava o fornecimento de assimilados ao cavalo. Acrescentou ainda que essa ação letal era possivelmente devida à produção, pelo cavaleiro, de uma substância tóxica ao cavalo, ou porque a folhagem daquele não fôsse capaz de produzir determinada substância alimentar necessária a êste.

Vários autores sugeriram que a tristeza era provavelmente uma moléstia de vírus. Bitancourt (5), entretanto, foi o primeiro que formulou a hipótese de que a injúria causada pela tristeza poderia resultar da falta de translocação para as raízes, devido ao bloqueio do floema na proximidade da união entre o cavalo e cavaleiro.

Os estudos de Schneider sôbre o "quick decline" (10) e os de Schneider, Bitancourt e Rossetti, sôbre a tristeza (11), apresentaram evidência de que, no caso de plantas de laranja doce enxertadas sôbre cavalo de azêda, infectadas por estas moléstias, há uma degeneração bem definida dos tubos crivados da laranja azêda na região de união entre cavalo e cavaleiro ou

ligeiramente abaixo desta. Nos estados mais avançados da moléstia, a degeneração dos tubos crivados pode-se estender até cerca de 45 cm acima ou abaixo do ponto de união entre os componentes do enxerto.

Em relação à causa da degeneração dos tubos crivados, Schneider (10) primeiramente sugeriu que alguma substância tóxica aos tubos crivados da laranja azêda e não aos tubos crivados da laranja doce é formada nas copas das plantas afetadas. Esta substância transloca-se no floema e, quando alcança os tubos crivados do cavalo da laranja azêda, induz o tubo crivado à degeneração. Schneider, Bitancourt e Rossetti (11) também sugeriram que o vírus da tristeza, ou um subproduto deste, presente na copa da laranja doce, se move em direção às raízes, junto com os alimentos elaborados, e causa a degeneração dos tubos crivados do cavalo de laranja azêda.

Bennett e Costa (4) reconheceram as possibilidades sugeridas pelos autores acima citados, mas acrescentaram também que a degeneração dos tubos crivados da laranja azêda, no caso de combinações de doce sobre azêda, afetadas por estas moléstias, pode resultar da atual multiplicação do vírus *in situ*, isto é, no conteúdo do floema da laranja doce ao mover-se no floema da azêda.

Uma terceira hipótese poderia também ser sugerida para explicar as dificuldades de translocação nas combinações afetadas: Como resultado da presença do vírus na planta, o mecanismo funcional das células do floema da laranja azêda na translocação poderia ser prejudicado, sendo o colapso do floema já um resultado da diminuição na translocação e não a sua causa.

Schneider (10) e outros (5, 11) atribuíram a manifestação dos sintomas da copa de combinações afetadas pelo "quick decline" e pela tristeza, à morte das radículas que ocorre devido ao bloqueio na passagem das substâncias elaboradas em direção às raízes. Bennett e Costa (4) discutiram estes pontos em relação à tristeza e, como resultado de observações e testes efetuados, concluíram que os primeiros sintomas da copa podem talvez resultar da acumulação excessiva de substâncias elaboradas e que este acúmulo pode preceder a morte das raízes que ocorre em seguida ao desaparecimento do amido de seus tecidos. Está claro, porém, que a morte das radículas influencia consideravelmente a manifestação posterior dos sintomas. Evidência a favor do acúmulo de substâncias na copa tem sido obtida em inoculações de plantas de laranja doce sobre azêda, as quais, em grande número de casos, mostram um entumescimento dos tecidos logo acima da zona de enxertia (est. 1-4). Este fato é mais comum em plantas que mostram sintomas moderadamente severos e que podem continuar vivas por bastante tempo. Plantas muito severamente atacadas podem morrer antes que o acúmulo de substâncias chegue a apresentar modificações tão visíveis.

Algumas experiências de anelagem, efetuadas pelos autores, confirmam o ponto de vista, já expresso anteriormente (4), de que a maioria dos sintomas mostrados por plantas de doce sobre azêda, afetadas pela tristeza, corresponde àqueles que se obtêm quando um anel de casca é retirado de

plantas da mesma combinação. Por outro lado, experiências de interenxertia com plantas compostas de copa e raízes de laranja doce, com um interenxerto de azêda, parecem indicar que o colapso do floema com a resultante diminuição na taxa de translocação não é a única causa operante na reação dos tecidos da laranja azêda.

Um interenxerto de laranja azêda, de 10 cm de comprimento, entre raízes e copa de laranja doce foi suficiente para causar injúria na copa, semelhante à de árvores de doce sobre azêda. Observa-se, além disso, que nestas plantas há um estrangulamento do interenxerto de azêda (est. 1-B), sendo a haste da laranja doce mais grossa tanto acima como abaixo do interenxerto. Isto sugere que, embora haja colapso do floema da laranja azêda, pelo menos no início, continua a haver translocação através do interenxerto para a parte inferior, translocação essa que é suficiente para permitir que a haste da laranja doce, abaixo, tenha um desenvolvimento correspondente ao da parte acima do interenxerto. É possível, portanto, que a razão da falta de desenvolvimento do interenxerto de azêda não seja atribuível à diminuição na translocação devida ao colapso do floema, mas a um efeito da moléstia sobre o câmbio ou outros tecidos da laranja azêda, evitando que a parte da azêda da haste se desenvolva na mesma proporção que a laranja doce.

3.1—RELAÇÃO ENTRE FATÔRES RESPONSÁVEIS PELA INJÚRIA E AS RAÍZES

Sendo a morte das radículas e raízes um dos sintomas predominantes do quadro sintomatológico da tristeza, pensou-se que as raízes dos cavalos de combinações suscetíveis pudessem ser diretamente afetadas pelo vírus e responsáveis pelos sintomas da parte aérea. Embora tenha sido verificado que os tecidos das raízes, da mesma maneira que os da haste de cavalos não tolerantes, podem ser afetados pela moléstia, a morte das radículas é principalmente manifestação secundária, não sendo necessária a presença de raízes de laranja azêda ou de cavalos do mesmo tipo para que haja manifestação de tristeza na copa das combinações suscetíveis.

A evidência neste sentido foi obtida em várias experiências :

a) Nas experiências de interenxertia já mencionadas, plantas compostas de copa e raízes de laranja doce, com um interenxerto de azêda, mostraram sintomas usuais de tristeza. Estes resultados confirmam as experiências relatadas por Toxopeus (13).

b) Experiências feitas com tipos de *Citrus* que apresentam sintomas de pé franco mostraram que esses tipos podem exibir sintomas de tristeza mesmo quando enxertados sobre cavalos tolerantes, como a laranja doce e alguns tângelos.

c) Em experiências de anelagem, verificou-se que plantas sadias, aneladas, mostram também morte das radículas, em tudo semelhante à que se observa em plantas de combinações afetadas pela tristeza.

d) Em uma outra experiência, efetuou-se o enxerto de garfos de laranja doce diretamente sobre as raízes de laranja azêda. Após pegamento



A — Plantas de laranja Caipira enxertadas em laranja azêda; **a** — afetadas pela tristeza, vendo-se o entumescimento da haste logo acima da zona de enxertia; **b** — controle sadio. **B** — Interenxerto de laranja azêda entre copa e raízes de laranja doce; notar sua constrictão.



Sintomas de tristeza em mudinhas de pé franco inoculadas (esquerda), em comparação com os contrôles. A — Tângelo Pearl 116. B — Lima Key.

do enxerto, as plantas assim obtidas, compostas de parte aérea de laranja doce e unicamente raízes de laranja azêda, foram inoculadas e mostraram posteriormente os sintomas usuais de tristeza.

É, pois, de se concluir que, no caso de cavalos não tolerantes, tanto os tecidos da haste como das raízes são sensíveis à ação do vírus ou toxina, não sendo, entretanto, necessária a presença de raízes com tecidos sensíveis para que haja manifestação da moléstia. Consoante já foi apontado por Bennett e Costa (4), para que os sintomas de tristeza se manifestem, basta haver uma copa na qual haja formação de vírus ou toxina e presença de tecidos sensíveis entre a copa e as raízes ou nas próprias raízes.

3.2—PRESENÇA DO VÍRUS DA TRISTEZA NAS RAÍZES DE PLANTAS DE COMBINAÇÕES TOLERANTES

A fim de verificar se o vírus da tristeza estava presente nas raízes de plantas de laranja Barão enxertadas sobre Caipira, descobriram-se as raízes de várias plantas em um laranjal e seccionaram-se algumas de cerca de 1 a 2 cm de diâmetro. A extremidade cortada, ligada à parte distal (sem conexão com a planta), foi então levantada acima do solo e deixada em posição oblíqua, a fim de facilitar a emissão de brotos. Protegeu-se a extremidade da raiz com uma caixa à prova de insetos. Alguns meses após, formaram-se brotos nas extremidades cortadas das raízes e, sobre estes brotos, colocaram-se afídeos não virulíferos que, após 24 horas, foram transferidos para plantas-teste de laranja doce sobre azêda. Em alguns casos usaram-se também as gemas desses brotos como inóculo. Dos brotos das raízes de três plantas diferentes, que foram ensaiadas dessa maneira, recuperou-se o vírus de todas três.

Em outra experiência aproveitaram-se os brotos desenvolvidos naturalmente das raízes de plantas da mesma combinação. Grupos de afídeos, retirados de 10 brotos nascidos das raízes de 10 plantas diferentes, transmitiram o vírus em nove casos para plantas-teste de doce sobre azêda.

Ainda está para ser verificado se o vírus da tristeza está presente nas raízes de laranja azêda no caso de plantas afetadas pela moléstia e enxertadas sobre este cavalo.

4 SINTOMAS DE TRISTEZA EM PLANTAS DE PÉ FRANCO

Contrariamente ao que se pensava no início dos estudos sobre a tristeza, as plantas de pé franco de certos tipos de *Citrus* mostram sintomas de tristeza quando infectadas. Este fato foi observado em numerosas inoculações realizadas em estufas, sob condições controladas, e também em experiências de campo.

As observações têm indicado que as mudinhas novas são mais suscetíveis e mostram sintomas mais visíveis que as mudas mais desenvolvidas. Entretanto, plantas de pé franco de um ano ou mais, de certos tipos, têm-se mostrado afetadas. Uma lista completa dos tipos que mostraram sintomas de pé franco é dada no quadro 3. Vê-se que mudinhas de alguns "grape-

fruits", limas, tângelos e de alguns limões mostram sintomas de pé franco, assim como de laranja azêda. Até mesmo mudinhas de laranja doce podem mostrar sintomas moderados de tristeza, após infecção.

Os sintomas apresentados pelos tipos de *Citrus*, que mostram tristeza de pé franco, pouco se diferenciam daqueles mostrados pelas plantas de combinações de enxertia, não tolerantes. Em linhas gerais, constam de cessação ou retardamento do crescimento, clorose e amarelecimento das fôlhas e morte das radículas. Esta parece ser mais acentuada no caso de mudinhas de laranja azêda e de certos limões, do que no caso de alguns "grapefruits" e de laranjas doces. A clorose das nervuras principal e secundárias não é sintoma tão notável como no caso das combinações de enxertia suscetível à injúria, mas foi observada em mudinhas de laranja Barão, de pé franco.

A observação parece indicar que os tipos de *Citrus* que possuem floema e outros tecidos relativamente tolerantes à presença do vírus podem mostrar sintomas moderados de pé franco em seguida à infecção, havendo mais tarde tendência para restabelecimento aparente. Os tipos de *Citrus* que possuem tecidos não tolerantes, quando infectados de pé franco, parecem mostrar sintomas mais severos e menor tendência para restabelecimento.

QUADRO 3.—Variedades de *Citrus* que mostraram sintomas de tristeza de pé franco em experiências de inoculação

Grupo	Variedades
Laranja azêda	Azêda comum, azêda n.º 2, Oklawaha, Paraguai, Dummett, Bitter Sweet (Stow), Tiawanica, Arancia Bizzarria A, Azêda sem Espinho.
Toranjás e zamboras	Ogami, Thong Dee, Siamese, Nakorn, Natsu Mikan, Fleming, Hawaiian, Índia Red.
Limões	Des 4 Saisons, Kulu, Lemelo, <i>Citrus</i> sp. (Lemon P. I. 10785), Lima Selvagem, Eureka.
Laranjas doces	Barão, Mediterrânea, Pêra, Flórida Sweet.
"Grapefruits"	Leonardy, Foster, Duncan, Marsh, Red Mexican, Royal, Thompson, Ruby Red (Hennings), Red Blush (Webb), Poorman's Orange, Tresca x tangerina Dancy.
Tângelos	Watt, Pina, Pearl, Tângelo 18-D-14, Tângelo 18-V-13, Tângelo 18-T-2.
Limas	Kadu Mul (Pink), Beledy, Kirk, Key, Lima de Umbigo.
Miscelânea	<i>Citrus longispina</i> (*) <i>Micromelum tephrocarpon</i> (*)

(*) Não há certeza sobre a classificação destas espécies.

O fato de plantas de pé franco de certas variedades mostrarem sintomas, quando infectadas pela tristeza, indica que a ação do vírus ou de uma toxina pode dar-se mesmo na ausência de uma zona crítica semelhante ao ponto de união entre o cavalo e cavaleiro. Em uma experiência procurou-se verificar se a enxertia tinha alguma importância em relação à manifestação de sintomas de tristeza pelos tipos que mostram sintomas de pé franco. Prepararam-se as seguintes plantas: 7 plantas de "grapefruit" Leonardy enxertadas sobre cavalo da mesma variedade e 7 plantas de "grapefruit" Duncan também enxertadas sobre a mesma variedade. Cada um destes enxertos foi inoculado, em comparação a plantas de pé franco da mesma variedade, com o vírus da tristeza, conservando-se o mesmo número de plantas como testemunhas não inoculadas. Nenhuma das testemunhas mostrou sintoma algum; tanto as 7 plantas de "grapefruit" Leonardy enxertadas como as 7 de pé franco mostraram sintomas. Das 7 plantas de "grapefruit" Duncan enxertadas, 5 mostraram sintomas, e também, das 7 plantas de pé franco, 5 mostraram sintomas. O grau de severidade dos sintomas foi também o mesmo, tanto para as plantas enxertadas como para as de pé franco.

Caso se procurasse explicar a manifestação dos sintomas de tristeza em plantas de pé franco como devida unicamente à degeneração do floema, seria necessário postular que essa degeneração poderia ocorrer de maneira dispersa, em níveis diferentes da planta, visto não haver uma zona crítica como o ponto de união do enxerto. Em virtude, porém, da pouca translocação lateral das plantas cítricas, o resultado final, devido ao colapso do floema em vários pontos da planta, não seria diferente daquele obtido quando este se dá principalmente em uma zona definida.

Como já foi referido em outra parte desta publicação, verificou-se que alguns tipos de *Citrus* que mostram sintomas severos de tristeza de pé franco, apresentam sintomas da moléstia também quando enxertados sobre laranjas doces ou sobre outros cavalos tolerantes, embora possam ser menos severos.

É possível que alguns dos tipos de *Citrus* que mostram sintomas de pé franco possam vir a ser usados diretamente como plantas-teste em experiências com a tristeza, substituindo a combinação doce sobre azêda, que vem sendo usada até agora. Será mais provável encontrar-se essa planta entre as limas ou tângelos não tolerantes. Estão em andamento algumas experiências visando esclarecer este ponto para estabelecer também, com maior rigor, a influência de outros fatores, como idade, vigor e suscetibilidade na manifestação dos sintomas de plantas de pé franco.

5—OBSERVAÇÕES GENÉTICAS SOBRE A REAÇÃO À TRISTEZA

Embora seja pequeno o número de progênes de híbridos e de tipos semelhantes a seus progenitores que foram até agora estudados quanto à sua reação à tristeza, os resultados obtidos são de interesse, razão pela qual será feita uma tentativa de análise genética dos característicos principais que resultam na manifestação da moléstia. As progênes dos híbridos ensaiados foram obtidas a partir de sementes vindas dos Estados Unidos e

produzidas por plantas híbridas, obtidas em cruzamentos controlados feitos naquele país.

As interpretações feitas em seguida estão baseadas na suposição de que a reação à tristeza resulta principalmente da interação entre os fatores — multiplicação do vírus na planta e tolerância ou sensibilidade dos tecidos da planta à presença do vírus ou toxina.

5.1—*PONCIRUS TRIFOLIATA* E HÍBRIDOS

Este grupo é dos que apresenta maior interesse. Todas as tentativas feitas até agora para recobrar o vírus da tristeza de plantas de *P. trifoliata*, repetidamente inoculadas, falharam. As tentativas para recobrar o vírus de plantas inoculadas desta espécie têm sido feitas por meio de afídeos e também por enxertia de borbulhas em plantas-teste de doce sobre azêda. Em muitos casos a borbulha de *P. trifoliata*, inserida nas plantas-teste, se desenvolveu, aumentando assim a possibilidade de transmissão, caso contivesse o vírus, mas os resultados foram sempre negativos.

Tentativas feitas para recobrar o vírus de plantas de *P. trifoliata*, que estão em cultivo na Estação Experimental de Limeira há muitos anos, sob condições onde existe abundância de inóculo, também falharam. Estes ensaios foram feitos enxertando-se borbulhas e garfos destas plantas sobre plantas-teste de laranja doce sobre azêda.

Os resultados atrás relatados parecem indicar que o vírus da tristeza não é capaz de se multiplicar nesta espécie ou que, pelo menos, não atinge nestas plantas uma concentração que permita ser recobrado pelos métodos usuais.

Resultados de numerosos ensaios feitos no campo mostram, por outro lado, que plantas de *P. trifoliata* podem ser usadas como cavalo para laranjas doces e outros tipos de *Citrus*, nos quais o vírus da tristeza se multiplica e atinge concentrações elevadas, sem que estas copas desenvolvam os sintomas da moléstia, mesmo quando o vírus está nelas presente. Isto parece indicar que o floema do cavalo *P. trifoliata* é tolerante à presença do vírus ou da toxina responsável pela injúria ao floema dos tipos sensíveis.

Híbridos entre *P. trifoliata* e laranjas doces (“citranges”) podem reagir da mesma forma que qualquer um dos pais. A maioria dos tipos estudados tem demonstrado possuir floema tolerante à presença do vírus, nos ensaios em que foram usados como cavalos para laranjas doces portadoras do vírus. Quando ensaiados como enxertos sobre cavalos de laranja azêda, alguns dos “citranges” se comportam como *P. trifoliata*, não dando nenhuma reação e indicando que provavelmente o vírus não se multiplica ou atinge apenas concentração muito diminuta nestas plantas. Outros tipos de “citranges” reagem da mesma forma que a laranja doce, mostrando sintomas de tristeza quando enxertados sobre cavalos de azêda.

A observação destes híbridos tem mostrado que não há correlação entre a forma da folha de *P. trifoliata* e a inabilidade em permitir multiplicação do vírus da tristeza. Alguns dos “citranges” ensaiados possuem essa forma de folha, mas permitem multiplicação do vírus.

Os retrocruzamentos de "citranges" para laranjas doces ("citrangor") mostram maior tendência para se comportarem como a laranja doce, o que é compreensível, pois nestes retrocruzamentos há naturalmente maior concentração de fatores da laranja doce do que no híbrido F₁.

Híbridos entre *P. trifoliata* e "grapefruits", denominados "citrumelos", parecem comportar-se, na maioria dos casos, como o progenitor *P. trifoliata*. Este fato parece indicar que os caracteres floema tolerante e inabilidade em permitir multiplicação do vírus do pai *P. trifoliata* são dependentes de fatores genéticos aparentemente dominantes sobre os fatores responsáveis por floema sensível, e habilidade em permitir multiplicação do vírus, características do outro progenitor, "grapefruit".

Os resultados com híbridos de composição genética mais complexa, como os "citrangedins" e "citrangquats", não têm sido bem definidos e não permitem ainda nenhuma interpretação.

5.2—*CITRUS PARADISI*

As variedades de *C. paradisi* estudadas têm demonstrado possuir floema intolerante à presença do vírus, quando são enxertadas com copa de laranja doce. Quando usadas como enxertos sobre laranja azêda, mostraram sintomas de tristeza, demonstrando, assim, que também permitem a multiplicação do vírus nos seus tecidos. A associação desses dois caracteres na mesma planta resulta na manifestação de sintomas de tristeza em indivíduos de pé franco, consoante já tinha sido previsto por Bennett e Costa (4). Do ponto de vista genético em relação à tristeza, as variedades de *C. paradisi* são de pouco valor para uso em cruzamentos visando a obtenção de cavalos tolerantes, a não ser quando se visa melhorá-las, cruzando-as com tipos que possuam tecidos tolerantes.

5.3—*CITRUS RETICULATA*, *C. SINENSIS* E HÍBRIDOS

As variedades de *C. reticulata* e de *C. sinensis* até agora estudadas, têm demonstrado possuir floema relativamente tolerante à presença do vírus na própria copa ou na copa de enxertos para os quais foram usadas como cavalos. Híbridos entre *C. reticulata* e *C. paradisi* (tângelos) reagem de duas maneiras diferentes. Alguns deles se comportam como o progenitor *C. reticulata*, demonstrando possuir floema tolerante e permitir multiplicação do vírus, enquanto que outros se comportam como *C. paradisi*, mostrando possuir floema intolerante e a capacidade para permitir multiplicação do vírus.

Cerca de metade dos tângelos que têm sido estudados parecem reagir como *C. reticulata*, não sendo possível afirmar que o característico floema tolerante também funciona como sendo devido a fatores dominantes ou parcialmente dominantes sobre floema sensível neste tipo de cruzamento.

No melhoramento genético dos *Citrus*, em relação à tristeza, parece mais interessante considerar-se apenas o problema da obtenção de melhores cavalos, possuidores de tecidos tolerantes à presença de vírus na copa, pois

esta terá que ser de variedades comerciais que, na maioria dos casos, permitem a multiplicação do vírus. É, portanto, de grande importância genética, para o melhoramento dos cavalos, o fato de ser o característico floema tolerante devido aparentemente a fatores dominantes, pelo menos em alguns tipos de cruzamentos. Este fato sugere que híbridos entre *Poncirus trifoliata* x *Citrus aurantium*, *C. reticulata* x *C. aurantium* e *C. sinensis* x *C. aurantium*, poderão dar origem a indivíduos que combinem a resistência e rusticidade da laranja azêda com os característicos de floema tolerante de outro progenitor. Caso tais híbridos possuíssem percentagem elevada de embriões nucelares, poderiam ser usados com vantagem como cavalo a partir de sementes de indivíduos F₁, pois neste caso não haveria perigo de recombinações fatoriais desvantajosas na progênie nucelar do híbrido, como no caso da progênie proveniente de embriões sexuais.

6—REAÇÃO DE GEMAS SADIAS E PORTADORAS DO VÍRUS SÔBRE DIFERENTES CAVALOS

Toxopeus (13), em suas observações sôbre a moléstia semelhante à tristeza que ocorre em Java, relatou que os enxertos de laranja doce, feitos sôbre cavalos de azêda, principiam a mostrar sintomas de declínio de dois a três meses após enxertia, e que usualmente as plantas morriam de oito a doze meses depois daquele período.

Oberholzer (9) verificou, na União Sul-Africana, que enxertos de laranja Valência sôbre laranja azêda, feitos com borbulhas de árvores do campo, principiavam a mostrar sintomas de declínio de um a três meses após enxertia, e que as plantas resultantes permaneciam sempre definhadas.

Bennett e Costa (4), usando borbulhas da variedade Baianinha, retiradas de plantas afetadas pela tristeza, observaram que os sintomas não apareciam tão rapidamente, e que, mesmo após doze meses, as plantas assim obtidas ainda possuíam certo vigor. Observações posteriores de Grant e Costa (7) mostraram, entretanto, que o brôto do enxerto proveniente de borbulhas portadoras de vírus, da variedade Barão (doce), sôbre laranja azêda era, a princípio, aparentemente sadio, mas já começava a mostrar sintomas de tristeza cêrca de três meses, ou menos, após enxertia, permanecendo os enxertos doentes definhados por períodos variáveis. Os resultados de Bennett e Costa devem, pois, ser interpretados como uma reação peculiar do clone de Baianinha usado ou porque essas borbulhas estavam invadidas por uma estirpe mais fraca do vírus.

O conhecimento adquirido em ensaios de cavalos enxertados com borbulhas portadoras e não portadoras do vírus da tristeza, das variedades Barão, Valência, tangerina Dancy, "grapefruits" Leonardy e Duncan, laranja azêda, limões, etc., tem mostrado que a reação das borbulhas portadoras de vírus varia de acôrdo com o tipo e vigor do cavalo, e também com a variedade do enxerto, sendo dependente do seu tipo de reação individual à tristeza. Têm-se observado dois tipos principais de reação, quando se enxertam borbulhas portadoras de vírus sôbre cavalo de azêda : a) Reação de gemas portadoras de tipos de *Citrus* que possuem tecidos tolerantes ;

b) A reação das gemas portadoras dos tipos de *Citrus* que possuem tecidos sensíveis.

No primeiro caso, que inclui o desenvolvimento de gemas portadoras de vírus, de laranja doce (est. 3), mandarinas, etc., o primeiro fluxo de crescimento é aparentemente normal e comparável ao de gemas sadias. Depois desse período de desenvolvimento normal, que varia geralmente de um a três meses mais ou menos, os brotos até então vigorosos principiam a mostrar os sintomas de declínio, sob a forma de amarelecimento, clorose das nervuras, mosqueado, etc. Está claro que nem todas as variedades dos grupos citados reagem igualmente, existindo variação entre elas como já foi relatado. Algumas demoram muito mais para mostrar os sintomas.

A fase de desenvolvimento normal da gema deste tipo, portadora de vírus, parece corresponder, como já foi apontado por Toxopeus (13), ao período em que a translocação se faz principalmente em direção ao brôto em crescimento, e o declínio se faz sentir algum tempo depois que os alimentos assimilados, formados no enxerto, principiam a se mover em direção às raízes, pois só então poderia o vírus ou toxina alcançar o floema do cavalo da azêda e assim causar injúria. Este fato é perfeitamente compreensível e constitui evidência de que o movimento do vírus da tristeza é correlato ao movimento da seiva elaborada, no floema, conforme foi verificado por Bennett (1, 2), para outros vírus.

A reação das gemas portadoras de vírus, dos tipos de *Citrus* que possuem tecidos sensíveis, difere da anterior porque os sintomas da moléstia são mostrados quase que imediatamente após o início da brotação e constam de crescimento muito retardado, clorose e aparência definhada do enxerto (est. 4).

No quadro 4 estão reproduzidos os dados de mensurações efetuadas em brotos de borbulhas portadoras de vírus e sadias, de vários tipos de *Citrus*, enxertados sobre cavalos tolerantes e não tolerantes. Os dados representam a média para os representantes de cada grupo ensaiado. Vê-se que o crescimento das borbulhas portadoras, de tipos possuidores de tecidos tolerantes, foi aproximadamente o mesmo, até os dois meses, sobre cavalos tolerantes e não tolerantes. Aos cinco meses, entretanto, o crescimento dos brotos deste tipo de borbulha tinha quase que duplicado sobre cavalos tolerantes, tendo permanecido estacionário sobre cavalos não tolerantes. No caso de borbulhas portadoras de tipos possuidores de tecidos sensíveis, já as mensurações feitas aos dois meses mostraram grande diferença de desenvolvimento em comparação com o crescimento das borbulhas sadias.

Os tipos de reação atrás relatados são compreensíveis quando se interpretam esses fenômenos na base do aumento do vírus ou toxina e na tolerância ou sensibilidade dos tecidos de enxerto e do cavalo ao princípio que causa injúria. No caso dos enxertos com tipos nos quais o vírus se multiplica, mas cujos tecidos são tolerantes, durante o primeiro fluxo de crescimento, do enxerto, a translocação no floema se faz principalmente em direção ascendente, havendo pouca possibilidade de que o vírus ou toxina se transloque em quantidades apreciáveis em direção às raízes e possa assim causar injúrias aos tecidos sensíveis do cavalo. No caso de enxertos com

QUADRO 4.—Comprimento do enxerto proveniente de borbulhas sadias e portadoras de tipos de *Citrus* com tecidos tolerantes e não tolerantes, enxertadas sobre cavalos tolerantes e não tolerantes, aos 2 e 5 meses após enxertia

Tecidos do enxerto	Estado da borbulha	Comprimento do enxerto nas épocas indicadas após enxertia, sobre cavalo			
		tolerante		não tolerante	
		2 meses	5 meses	2 meses	5 meses
		<i>cm</i>	<i>cm</i>	<i>cm</i>	<i>cm</i>
TOLERANTES :					
Caipira (clone).....	Sadia	18	38
	Portadora	14	14
Barão A	Sadia	23	50	30	48
Barão B (clone)	Portadora	16	30	17	17
NÃO TOLERANTES :					
"Grapefruits"	Sadia	23	59
	Portadora	11	12
Tângelos	Sadia	30	51
	Portadora	5	7
Limões.....	Sadia	40	63
	Portadora	6	8
Limas	Sadia	46	70
	Portadora	8	20

tipos nos quais o vírus se multiplica, mas que também possui tecidos sensíveis, embora a direção de translocação no início seja ascendente, a presença do vírus nos tecidos sensíveis provavelmente induz degenerescência do floema e injúria a outros tecidos, logo de início, com os resultantes distúrbios na translocação e desenvolvimento do brôto. Disto resulta o imediato aparecimento dos sintomas da moléstia.

Explicação semelhante poderia ser dada para o aparecimento de fluxos de crescimento, aparentemente sadios a princípio, em plantas bastante afetadas pela tristeza. É de se julgar que o crescimento mantém-se aparentemente sadio apenas durante a fase em que a translocação se faz principalmente em direção ao brôto, à custa das reservas da planta. Assim que os brotos principiam a enviar assimilados em direção às raízes, há degenerescência do floema ou de outros tecidos do cavalo correspondentes ao novo brôto, com o consequente aparecimento de sintomas nestes.

De grande importância prática é o conhecimento do comportamento de borbulhas portadoras e sadias sobre os cavalos tolerantes. A maioria das observações feitas parece indicar que os enxertos feitos com borbulhas



Broto de laranja Barão enxertados sobre laranja azêda e fotografados cinco meses após enxertia. A — Brotos saudáveis provenientes de borbulhas saudáveis, retiradas de mudinhas obtidas de semente. B — Brotos provenientes de borbulhas portadoras do vírus, principiando a mostrar os sintomas de tristeza, embora o fluxo de crescimento inicial tivesse aparência saudável.



Broto proveniente de borbulha portadora (esquerda) e de borbulha sadia, cinco meses após enxertia. A — Limão "Des Quatre Saisons"; B — Lima Kirk.

portadoras de vírus, em cavalos tolerantes, se desenvolvem normalmente, a não ser quando as borbulhas pertencem a tipos cujos tecidos são sensíveis, caso este em que os enxertos poderão mostrar sintomas. Por outro lado, é possível que algumas combinações de enxertia, em que a árvore foi formada com borbulha livre de vírus, possam mostrar-se tolerantes à moléstia, ao passo que a mesma combinação pode mostrar-se parcialmente intolerante se a enxertia fôr feita com borbulha portadora. Esta tendência parece estar sendo observada com o limão rugoso nacional e com a lima da Pérsia. Experiências minuciosas a esse respeito estão em andamento, e permitirão uma melhor elucidação destes problemas.

7—DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS NA PLANTA

Um dos pontos fundamentais ainda para ser determinado definitivamente em relação à tristeza, é saber-se se o vírus causador da moléstia é vírus do parênquima ou do floema. Em experiências preliminares de anelagem, visando estabelecer isto, obtiveram-se resultados que parecem indicar que o vírus da tristeza é vírus do floema.

Plantas da variedade Barão (doce), sobre cavalos de azêda, foram preparadas de tal forma que possuísem dois galhos principais apenas. De um dos galhos de cada planta retirou-se então um anel da casca, de mais ou menos 2 cm de largura, eliminando-se assim toda a conexão do floema entre a parte superior do galho e o restante da planta, permanecendo apenas as ligações vasculares do xilema e de parênquima. Posteriormente, inocularam-se somente os galhos anelados destas plantas, a fim de verificar-se se o vírus da tristeza era capaz de atravessar a região do anel. De cinco plantas preparadas da maneira indicada, três foram prejudicadas por forte vento que quebrou o galho anelado. As duas plantas restantes permaneceram em boas condições e, 16 meses após a inoculação, foram testadas para presença de vírus.

Nos dois casos verificou-se que o vírus estava presente no galho inoculado e anelado, ao passo que o restante da planta não possuía vírus algum. Isto indica que o vírus não foi capaz de mover-se através dos tecidos da parte anelada em um período de 16 meses, e, embora não seja evidência conclusiva, parece indicar que o vírus da tristeza é vírus do floema.

Em outros testes tentou-se também determinar se o vírus da tristeza está presente em tecidos de parênquima, efetuando-se enxertia de aproximação de garfos de laranja doce afetada pela moléstia em plantas-teste de doce sobre azêda, tendo-se o cuidado de retirar a casca do garfo na região do enxerto. Desta maneira, caso houvesse passagem do vírus do garfo para a planta-teste, esta ter-se-ia dado em virtude da presença do vírus em tecidos de parênquima ou xilema do garfo, visto que estes eram os únicos tipos de tecido em contacto com a planta-teste. Não foi, entretanto, possível obter pegamento destes enxertos.

Em outros ensaios, procurou-se verificar se o vírus da tristeza poderia ser transmitido, introduzindo-se, sob a casca de plantas-teste de doce sobre azêda, pedaços de tecidos do lenho de plantas afetadas. Caso houvesse

transmissão, poder-se-ia afirmar que o vírus era provavelmente um vírus de parênquima. Nenhum caso positivo de transmissão foi obtido nestas experiências, mas o resultado negativo neste caso tem pouco valor, pois pode ser devido à falta de união orgânica entre o tecido introduzido e os tecidos da planta-teste.

7.1—PRESENÇA DO VÍRUS NAS GEMAS DE PLANTAS AFETADAS

A enxertia de várias centenas de gemas obtidas de plantas adultas da variedade Barão, portadoras do vírus da tristeza há vários anos, tem demonstrado que o vírus está presente em tôdas as gemas da planta retiradas de galhos de cerca de um ano. Por outro lado, enxertias feitas com borbulhas de plantas infectadas em tempo relativamente recente, mostrou que nem tôdas as gemas da planta encerram o vírus. Êste fato foi observado em maior escala para gemas retiradas de plantas afetadas de "grapefruit" Duncan e de laranja azêda e, em menor número de casos, para plantas de tangerina Dancy e laranja Valência.

Duas explicações parecem mais prováveis para estas observações: a) Em plantas infectadas em época relativamente recente, a distribuição do vírus na planta não é total e as gemas que já se achavam maduras antes da infecção podem deixar de ser invadidas pelo vírus. Já as gemas formadas em galhos desenvolvidos após infecção contêm, tôdas, o vírus. b) Como o fato foi observado principalmente para "grapefruit" e laranja azêda, é possível que as plantas cujos tecidos não são tolerantes apresentem certo obstáculo à invasão pelo vírus, e que êste não seja totalmente sistêmico na planta. Experiências mais minuciosas estão em andamento, a fim de esclarecer êstes pontos.

SUMMARY

The writers review previous concepts concerning the reaction of citrus plants to the tristeza disease. It is recognized that environmental factors such as temperature, humidity and light can influence plant reaction, but these are considered of relatively minor importance. Characteristics of the plant itself govern its reaction to the disease and among those, resistance to infection, ability to permit virus increase and tolerance or non-tolerance of tissues are considered most important.

Tests using viruliferous oriental citrus aphids for inoculation of various citrus types budded over sour orange rootstocks (table 1 and 2) showed a correlation between susceptibility to infection and severity of symptoms. The sweet oranges proved to be the most susceptible to infection and showed severe disease symptoms. The Barão sweet orange appeared to be more susceptible than Valencia. The mandarins tended to show some resistance to infection, but when infected, severe symptoms developed. The tolerant tangelos (7) behaved similarly to sweet oranges: They were very susceptible to infection and showed severe symptoms. The non-tolerant tangelos, susceptible citranges (7) and grapefruits behaved more or less alike, and showed medium susceptibility to infection and moderately severe disease symptoms. Among the grapefruits, Leonardy was observed to be relatively more susceptible and showed more severe symptoms than Duncan. The pummelos, shaddocks and sour oranges were comparatively very resistant to infection and showed only moderate symptoms when infected. It has been found that the sour oranges can be more easily infected by tissue union than by the aphid vector. *Poncirus trifoliata*, citrumelos and resistant citranges showed no symptoms and no virus could be recovered from the inoculated plants even after three inoculations.

portadoras de vírus, em cavalos tolerantes, se desenvolvem normalmente, a não ser quando as borbulhas pertencem a tipos cujos tecidos são sensíveis, caso êste em que os enxertos poderão mostrar sintomas. Por outro lado, é possível que algumas combinações de enxertia, em que a árvore foi formada com borbulha livre de vírus, possam mostrar-se tolerantes à moléstia, ao passo que a mesma combinação pode mostrar-se parcialmente intolerante se a enxertia fôr feita com borbulha portadora. Esta tendência parece estar sendo observada com o limão rugoso nacional e com a lima da Pérsia. Experiências minuciosas a êsse respeito estão em andamento, e permitirão uma melhor elucidação dêstes problemas.

7—DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS NA PLANTA

Um dos pontos fundamentais ainda para ser determinado definitivamente em relação à tristeza, é saber-se se o vírus causador da moléstia é vírus do parênquima ou do floema. Em experiências preliminares de anelagem, visando estabelecer isto, obtiveram-se resultados que parecem indicar que o vírus da tristeza é vírus do floema.

Plantas da variedade Barão (doce), sôbre cavalos de azêda, foram preparadas de tal forma que possuíssem dois galhos principais apenas. De um dos galhos de cada planta retirou-se então um anel da casca, de mais ou menos 2 cm de largura, eliminando-se assim tôda a conexão do floema entre a parte superior do galho e o restante da planta, permanecendo apenas as ligações vasculares do xilema e de parênquima. Posteriormente, inocularam-se sômente os galhos anelados destas plantas, a fim de verificar-se se o vírus da tristeza era capaz de atravessar a região do anel. De cinco plantas preparadas da maneira indicada, três foram prejudicadas por forte vento que quebrou o galho anelado. As duas plantas restantes permaneceram em boas condições e, 16 meses após a inoculação, foram testadas para presença de vírus.

Nos dois casos verificou-se que o vírus estava presente no galho inoculado e anelado, ao passo que o restante da planta não possuía vírus algum. Isto indica que o vírus não foi capaz de mover-se através dos tecidos da parte anelada em um período de 16 meses, e, embora não seja evidência conclusiva, parece indicar que o vírus da tristeza é vírus do floema.

Em outros testes tentou-se também determinar se o vírus da tristeza está presente em tecidos de parênquima, efetuando-se enxertia de aproximação de garfos de laranja doce afetada pela moléstia em plantas-teste de doce sôbre azêda, tendo-se o cuidado de retirar a casca do garfo na região do enxerto. Desta maneira, caso houvesse passagem do vírus do garfo para a planta-teste, esta ter-se-ia dado em virtude da presença do vírus em tecidos de parênquima ou xilema do garfo, visto que êstes eram os únicos tipos de tecido em contacto com a planta-teste. Não foi, entretanto, possível obter pagamento dêstes enxertos.

Em outros ensaios, procurou-se verificar se o vírus da tristeza poderia ser transmitido, introduzindo-se, sob a casca de plantas-teste de doce sôbre azêda, pedaços de tecidos do lenho de plantas afetadas. Caso houvesse

transmissão, poder-se-ia afirmar que o vírus era provavelmente um vírus de parênquima. Nenhum caso positivo de transmissão foi obtido nestas experiências, mas o resultado negativo neste caso tem pouco valor, pois pode ser devido à falta de união orgânica entre o tecido introduzido e os tecidos da planta-teste.

7.1—PRESENÇA DO VÍRUS NAS GEMAS DE PLANTAS AFETADAS

A enxertia de várias centenas de gemas obtidas de plantas adultas da variedade Barão, portadoras do vírus da tristeza há vários anos, tem demonstrado que o vírus está presente em tôdas as gemas da planta retiradas de galhos de cêrca de um ano. Por outro lado, enxertias feitas com borbulhas de plantas infectadas em tempo relativamente recente, mostrou que nem tôdas as gemas da planta encerram o vírus. Êste fato foi observado em maior escala para gemas retiradas de plantas afetadas de "grapefruit" Duncan e de laranja azêda e, em menor número de casos, para plantas de tangerina Dancy e laranja Valência.

Duas explicações parecem mais prováveis para estas observações: a) Em plantas infectadas em época relativamente recente, a distribuição do vírus na planta não é total e as gemas que já se achavam maduras antes da infecção podem deixar de ser invadidas pelo vírus. Já as gemas formadas em galhos desenvolvidos após infecção contêm, tôdas, o vírus. b) Como o fato foi observado principalmente para "grapefruit" e laranja azêda, é possível que as plantas cujos tecidos não são tolerantes apresentem certo obstáculo à invasão pelo vírus, e que êste não seja totalmente sistêmico na planta. Experiências mais minuciosas estão em andamento, a fim de esclarecer êstes pontos.

SUMMARY

The writers review previous concepts concerning the reaction of citrus plants to the tristeza disease. It is recognized that environmental factors such as temperature, humidity and light can influence plant reaction, but these are considered of relatively minor importance. Characteristics of the plant itself govern its reaction to the disease and among those, resistance to infection, ability to permit virus increase and tolerance or non-tolerance of tissues are considered most important.

Tests using viruliferous oriental citrus aphids for inoculation of various citrus types budded over sour orange rootstocks (table 1 and 2) showed a correlation between susceptibility to infection and severity of symptoms. The sweet oranges proved to be the most susceptible to infection and showed severe disease symptoms. The Barão sweet orange appeared to be more susceptible than Valencia. The mandarins tended to show some resistance to infection, but when infected, severe symptoms developed. The tolerant tangelos (7) behaved similarly to sweet oranges: They were very susceptible to infection and showed severe symptoms. The non-tolerant tangelos, susceptible citranges (7) and grapefruits behaved more or less alike, and showed medium susceptibility to infection and moderately severe disease symptoms. Among the grapefruits, Leonardy was observed to be relatively more susceptible and showed more severe symptoms than Duncan. The pummelos, shaddockes and sour oranges were comparatively very resistant to infection and showed only moderate symptoms when infected. It has been found that the sour oranges can be more easily infected by tissue union than by the aphid vector. *Poncirus trifoliata*, citrumelos and resistant citranges showed no symptoms and no virus could be recovered from the inoculated plants even after three inoculations.

The nature of injury caused by tristeza in the non-tolerant graft and intergraft combinations is discussed. The observation of symptoms shown by plants consisting of a sour orange inter-stem-graft between sweet orange roots and foliage seems to indicate that phloem collapse of the sour intergraft does not entirely prevent food translocation, since under field conditions the sweet stem below the sour intergraft continued, for almost two years, to increase in size at about the same rate as the sweet stem above. The growth of the sour intergraft was observed to be constricted and its lack of developments indicates a possible injurious effect of the disease on tissues other than the phloem.

Root tissues of sour oranges have been found to be sensitive to injury, since sweet orange tops grafted directly onto sour orange roots and subsequently inoculated showed the usual tristeza symptoms. Death of rootlets and roots was found to occur not only in infected plants with tolerant tops and non-tolerant rootstocks but also on infected tolerant plants having an inter-stem-graft of non-tolerant sour orange. These observations and those made of root reaction on mechanically ringed plants indicate that although the root tissues of non-tolerant stocks may be sensitive to injury the rootlet and root symptoms are mostly secondary reactions.

Tests carried out showed that the tristeza virus was recovered from insect protected sprouts grown at the ends of severed roots of Caipira sweet orange stock thus indicating that the virus was definitely present in the roots of a tolerant rootstock.

Previously tristeza has been recognized as being associated with various citrus stock-scion combinations. In the present paper 50 seedling types have been reported as showing tristeza symptoms following heavy aphid inoculation. The symptoms shown by infected seedlings are similar to those shown by non-tolerant stock-scion combinations. Small sweet orange seedlings have been observed to show some symptoms of tristeza following heavy inoculations, but citrus types possessing tolerant tissues have shown a tendency toward recovery from symptom expression.

The writers, on the basis of observed plant responses, have discussed the mode of inheritance of the main characteristic involved in plant reaction to tristeza. Some seedling progenies of known crosses between *Poncirus trifoliata* and sweet oranges (citranges) have been found to permit virus increase as the sweet orange parent does, whereas others behave like *P. trifoliata* and apparently do not permit virus multiplication. No relationship has been found between the trifoliata leaf-shape and inability to permit virus increase, since some of the hybrids that possess the trifoliata leaves, permit virus multiplication. Backcrosses of citranges to sweet oranges show a tendency to behave like the sweet orange parent. Hybrids between *P. trifoliata* and grapefruits (citrumelos) have behaved in most cases as the parent *P. trifoliata*. This seems to indicate that tolerant tissues and inability to permit virus increase are dependent on dominant factors in this type of cross. Hybrids between *Citrus reticulata* and *C. paradisi* (tangelos) do not show a clear-cut type of inheritance. Some tangelos behave like the mandarin parent, possessing tolerant tissues; others behave like the grapefruit parent indicating possession of non-tolerant tissues. The inability to permit virus increase is a characteristic of little value in a rootstock improvement since tops of most commercial citrus varieties permit virus multiplication. It is pointed out that improvement of citrus rootstock with respect to tristeza should be aimed at combining tolerant tissues such as found in *P. trifoliata* or hybrids, *C. sinensis*, *C. reticulata*, etc., with other favorable characters such as vigor, resistance to gummosis, etc.

Field tests showed that the reaction of infective buds on different rootstocks varies not only according to the tolerance of non-tolerance of the rootstock tissues, but also according to whether the buds themselves belong to types that possess non-tolerant or tolerant tissues. Infective buds of tolerant types, as sweet oranges, when budded on non-tolerant stocks produce a first flush of growth that is apparently healthy, but which later shows disease symptoms. For a period of about two months from date of budding, there is little or no difference between sprouts from healthy or infective buds of tolerant types. In contrast, when infective buds of non-tolerant types are budded on non-tolerant stocks, disease symptoms appear practically as soon as the buds start to grow. Observations indicate that infective buds from tolerant citrus types when budded on tolerant stocks usually do not develop symptoms even though the plant is a carrier of the virus. On the other hand observations indicate that infective buds of non-tolerant citrus types

when budded on tolerant stocks may at times produce some symptoms. A possible explanation for the above-mentioned reactions is presented and is based on the relation between virus movement and food translocation in the plant.

In the study of the relationship of tristeza virus to host tissues, plants composed of a sweet top over sour orange rootstock were allowed to develop two sweet orange branches. One branch of each plant was then ringed and inoculated by the vector. The branch not inoculated did not develop symptoms and 16 months after inoculation, buds were taken from the inoculated and the non-inoculated branches and tested for presence of virus. All buds taken from the inoculated ringed branches were found to be carrying the virus, whereas the buds taken from the other branch of the same plant did not have any virus. This experiment shows that the tristeza virus was not able to move across the ringed portion of the stem during that period, thus indicating that the tristeza virus is probably a phloem virus.

Results from extensive buddings of various citrus stocks in the field indicate that buds taken from old sweet orange plants that have been known to be infected for a long time have been found to carry the virus in all buds. On the other hand, tests with buds taken from young plants recently infected, of Duncan grapefruit, sour orange and in some cases of Dancy tangerine and Valencia sweet orange, showed that not all buds were carrying the virus. It is not yet known whether buds that are mature prior to infection may temporarily escape virus invasion or whether citrus types which have non-tolerant tissues may limit to a certain extent complete systemic invasion of the tristeza virus.

LITERATURA CITADA

1. Bennett, C. W. Correlation Between Movement of the Curly Top Virus and Translocation of Food in Tobacco and Sugarbeet. Jour. Agr. Res. 54 : 479-502. 1937.
2. Bennett, C. W. Relation of Food Translocation to Movement of Virus of Tobacco Mosaic. Jour. Agr. Res. 60 : 361-390. 1940.
3. Bennett, C. W. e A. S. Costa. A Preliminary Report of Work at Campinas, Brazil, on Tristeza Disease of Citrus. Proc. Fla. State Hort. Soc. (1947). 60 : 11-16. 1948.
4. Bennett, C. W. e A. S. Costa. Tristeza Disease of Citrus. Jour. Agr. Res. 78 : 207-237. 1949.
5. Bitancourt, A. A. Um Teste para Identificação Precoce da Tristeza dos Citrus. O Biológico 10 : 169-175. 1944.
6. Camp, A. F. The Tristeza Disease of Citrus in Argentina. Proc. Fla. State Hort. Soc. (1948). 61 : 15-19. 1949.
7. Grant, T. J. e A. S. Costa. A Progress Report on Studies of Tristeza Disease of Citrus in Brazil. 1. Behavior of 2 Number of Varieties as Stocks for Sweet Orange and Grapefruit, and as Scions over Sour Orange Rootstock, when Inoculated with the Tristeza Virus. Proc. Fla. State Hort. Soc. (1948). 61 : 20-33. 1949.
8. Marloth, R. H. The Citrus Rootstock Problem: Citrus Tree Propagation. Farming in South Africa 13 : 226-231. 1933.
9. Oberholzer, P. C. J. Bitter-Seville Rootstock Problem. Farming in South Africa 22 : 489-495. 1947.
10. Schneider, H. A Progress Report on Quick Decline Studies : Histological Studies (Part III). Calif. Citrog. 31 : 198-199. 1946.
11. Schneider, H., A. A. Bitancourt e V. Rossetti. Similarities in the Pathological Anatomy of Quick-Dcline-and Tristeza-Diseased Orange Trees. (Abstract) Phytopathology 37 : 845-846. 1947.
12. Schults, E. S., C. F. Clark e F. J. Stevenson. Resistance of Potato to Viruses A⁺ & X, Components of Mild Mosaic, Phytopathology 30 : 944-951. 1940.
13. Toxopeus, H. J. Stock-Scion Incompatibility in Citrus and Its Cause. Jour. Pomol. and Hort. Sci. 14 : 360-364. 1937.

The nature of injury caused by tristeza in the non-tolerant graft and intergraft combinations is discussed. The observation of symptoms shown by plants consisting of a sour orange inter-stem-graft between sweet orange roots and foliage seems to indicate that phloem collapse of the sour intergraft does not entirely prevent food translocation, since under field conditions the sweet stem below the sour intergraft continued, for almost two years, to increase in size at about the same rate as the sweet stem above. The growth of the sour intergraft was observed to be constricted and its lack of development indicates a possible injurious effect of the disease on tissues other than the phloem.

Root tissues of sour oranges have been found to be sensitive to injury, since sweet orange tops grafted directly onto sour orange roots and subsequently inoculated showed the usual tristeza symptoms. Death of rootlets and roots was found to occur not only in infected plants with tolerant tops and non-tolerant rootstocks but also on infected tolerant plants having an inter-stem-graft of non-tolerant sour orange. These observations and those made of root reaction on mechanically ringed plants indicate that although the root tissues of non-tolerant stocks may be sensitive to injury the rootlet and root symptoms are mostly secondary reactions.

Tests carried out showed that the tristeza virus was recovered from insect protected sprouts grown at the ends of severed roots of Caipira sweet orange stock thus indicating that the virus was definitely present in the roots of a tolerant rootstock.

Previously tristeza has been recognized as being associated with various citrus stock-scion combinations. In the present paper 50 seedling types have been reported as showing tristeza symptoms following heavy aphid inoculation. The symptoms shown by infected seedlings are similar to those shown by non-tolerant stock-scion combinations. Small sweet orange seedlings have been observed to show some symptoms of tristeza following heavy inoculations, but citrus types possessing tolerant tissues have shown a tendency toward recovery from symptom expression.

The writers, on the basis of observed plant responses, have discussed the mode of inheritance of the main characteristics involved in plant reaction to tristeza. Some seedling progenies of known crosses between *Poncirus trifoliata* and sweet oranges (citranges) have been found to permit virus increase as the sweet orange parent does, whereas others behave like *P. trifoliata* and apparently do not permit virus multiplication. No relationship has been found between the trifoliata leaf-shape and inability to permit virus increase, since some of the hybrids that possess the trifoliata leaves, permit virus multiplication. Backcrosses of citranges to sweet oranges show a tendency to behave like the sweet orange parent. Hybrids between *P. trifoliata* and grapefruits (citrumelos) have behaved in most cases as the parent *P. trifoliata*. This seems to indicate that tolerant tissues and inability to permit virus increase are dependent on dominant factors in this type of cross. Hybrids between *Citrus reticulata* and *C. paradisi* (tangelos) do not show a clear-cut type of inheritance. Some tangelos behave like the mandarin parent, possessing tolerant tissues; others behave like the grapefruit parent indicating possession of non-tolerant tissues. The inability to permit virus increase is a characteristic of little value in a rootstock improvement since tops of most commercial citrus varieties permit virus multiplication. It is pointed out that improvement of citrus rootstock with respect to tristeza should be aimed at combining tolerant tissues such as found in *P. trifoliata* or hybrids, *C. sinensis*, *C. reticulata*, etc., with other favorable characters such as vigor, resistance to gummosis, etc.

Field tests showed that the reaction of infective buds on different rootstocks varies not only according to the tolerance of non-tolerance of the rootstock tissues, but also according to whether the buds themselves belong to types that possess non-tolerant or tolerant tissues. Infective buds of tolerant types, as sweet oranges, when budded on non-tolerant stocks produce a first flush of growth that is apparently healthy, but which later shows disease symptoms. For a period of about two months from date of budding, there is little or no difference between sprouts from healthy or infective buds of tolerant types. In contrast, when infective buds of non-tolerant types are budded on non-tolerant stocks, disease symptoms appear practically as soon as the buds start to grow. Observations indicate that infective buds from tolerant citrus types when budded on tolerant stocks usually do not develop symptoms even though the plant is a carrier of the virus. On the other hand observations indicate that infective buds of non-tolerant citrus types

when budded on tolerant stocks may at times produce some symptoms. A possible explanation for the above-mentioned reactions is presented and is based on the relation between virus movement and food translocation in the plant.

In the study of the relationship of tristeza virus to host tissues, plants composed of a sweet top over sour orange rootstock were allowed to develop two sweet orange branches. One branch of each plant was then ringed and inoculated by the vector. The branch not inoculated did not develop symptoms and 16 months after inoculation, buds were taken from the inoculated and the non-inoculated branches and tested for presence of virus. All buds taken from the inoculated ringed branches were found to be carrying the virus, whereas the buds taken from the other branch of the same plant did not have any virus. This experiment shows that the tristeza virus was not able to move across the ringed portion of the stem during that period, thus indicating that the tristeza virus is probably a phloem virus.

Results from extensive buddings of various citrus stocks in the field indicate that buds taken from old sweet orange plants that have been known to be infected for a long time have been found to carry the virus in all buds. On the other hand, tests with buds taken from young plants recently infected, of Duncan grapefruit, sour orange and in some cases of Dancy tangerine and Valencia sweet orange, showed that not all buds were carrying the virus. It is not yet known whether buds that are mature prior to infection may temporarily escape virus invasion or whether citrus types which have non-tolerant tissues may limit to a certain extent complete systemic invasion of the tristeza virus.

LITERATURA CITADA

1. **Bennett, C. W.** Correlation Between Movement of the Curly Top Virus and Translocation of Food in Tobacco and Sugarbeet. *Jour. Agr. Res.* **54** : 479-502. 1937.
2. **Bennett, C. W.** Relation of Food Translocation to Movement of Virus of Tobacco Mosaic. *Jour. Agr. Res.* **60** : 361-390. 1940.
3. **Bennett, C. W. e A. S. Costa.** A Preliminary Report of Work at Campinas, Brazil, on Tristeza Disease of Citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* (1947). **60** : 11-16. 1948.
4. **Bennett, C. W. e A. S. Costa.** Tristeza Disease of Citrus. *Jour. Agr. Res.* **78** : 207-237. 1949.
5. **Bitancourt, A. A.** Um Teste para Identificação Precoce da Tristeza dos Citrus. *O Biológico* **10** : 169-175. 1944.
6. **Camp, A. F.** The Tristeza Disease of Citrus in Argentina. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* (1948). **61** : 15-19. 1949.
7. **Grant, T. J. e A. S. Costa.** A Progress Report on Studies of Tristeza Disease of Citrus in Brazil. 1. Behavior of 2 Number of Varieties as Stocks for Sweet Orange and Grapefruit, and as Scions over Sour Orange Rootstock, when Inoculated with the Tristeza Virus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* (1948). **61** : 20-33. 1949.
8. **Marloth, R. H.** The Citrus Rootstock Problem: Citrus Tree Propagation. *Farming in South Africa* **13** : 226-231. 1938.
9. **Oberholzer, P. C. J.** Bitter-Seville Rootstock Problem. *Farming in South Africa* **22** : 489-495. 1947.
10. **Schneider, H.** A Progress Report on Quick Decline Studies: Histological Studies (Part III). *Calif. Citrog.* **31** : 198-199. 1946.
11. **Schneider, H., A. A. Bitancourt e V. Rossetti.** Similarities in the Pathological Anatomy of Quick-Dieback and Tristeza-Diseased Orange Trees. (Abstract) *Phytopathology* **37** : 845-846. 1947.
12. **Schults, E. S., C. F. Clark e F. J. Stevenson.** Resistance of Potato to Viruses A & X, Components of Mild Mosaic. *Phytopathology* **30** : 944-951. 1940.
13. **Toxopeus, H. J.** Stock-Scion Incompatibility in Citrus and Its Cause. *Jour. Pomol. and Hort. Sci.* **14** : 360-364. 1937.

SEÇÕES TÉCNICAS

- Secção de Agrogeologia** : — J. E. de Paiva Neto, M. S. Queiroz, M. Gutmans, A. C. Nascimento, A. Küpper, R. A. Catani, F. C. Verdade, H. P. Medina, Washington de Jorge, A. Klinck, M. T. Piza.
- Secção de Botânica** : — D. M. Dedecca.
- Secção de Café** : — J. E. T. Mendes, F. R. Pupo de Moraes, H. J. Scaranari.
- Secção de Cana de Açúcar** : — J. M. de Aguirre Júnior, C. Côrte Brilho, J. B. Rodrigues, A. L. Segala.
- Secção de Cereais e Leguminosas** : — G. P. Viegas, N. A. Neme, H. da Silva Miranda, M. Alcover, J. Gomes da Silva, J. Andrade Sobrinho.
- Secção de Conservação do Solo** : — J. Quintiliano de A. Marques, F. Grohmann, J. Berton, F. M. Aires de Alencar.
- Secção de Entomologia** : — J. Bergamin, Luiz O. T. Mendes, Romeu de Tela.
- Secção de Fisiologia e Alimentação de Plantas** : — C. M. Franco, Osvaldo Bacchi, R. Inforzato, H. C. Mendes.
- Secção de Fitopatologia Aplicada** : — A. P. Viegas, A. R. Teixeira, L. Cardoso, C. G. Teixeira.
- Secção de Fumo, Plantas Inseticidas e Medicinais** : — A. R. Lima, S. Ribeiro dos Santos, A. Jacob.
- Secção de Oleaginosas** : — O. Ferreira de Sousa, V. Canecchio Filho, A. C. Rúbia, E. Abramides.
- Secção de Química Mineral** : — J. B. C. Néri Sobrinho, A. de Sousa Gomide, F. L. Serafini, J. A. Neger, I. Mendes.
- Secção de Raízes e Tubérculos** : — J. Bierrenbach de Castro, Edgar S. Normanha, A. Pais de Camargo, O. J. Boock, A. S. Pereira.
- Secção de Tecnologia Agrícola** : — A. Frota de Sousa, J. P. Néri, A. de Arruda Veiga, E. Castanho de Andrade.
- Secção de Técnica Experimental e Cálculo** : — C. G. Fraga Júnior, A. Conagin.

ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS

- Central de Campinas** : — R. Forster, Miguel A. Anderson, R. Munhoz.
- Boracéia** : —
- Capão Bonito** : — A. Rigitano.
- Jaú** : — Hélio de Moraes.
- Jundiá** : — J. S. Inglês de Sousa.
- Limeira** : — C. Piza.
- Mococa** : — M. Vieira de Moraes.
- Monte Alegre (Ibiti)** : — A. Gentil Gomes.
- Pederneiras** : — F. Beltrame.
- Pindamonhangaba** : — R. A. Rodrigues.
- Pindorama** : — J. Aloisi Sobrinho.
- Piracicaba** : — A. Correia de Arruda.
- Pirajuí** : — J. Alves de Moraes.
- Ribeirão Preto** : — O. A. Mamprim.
- Santa Rita do Passa Quatro** : — J. A. A. C. Pacheco.
- São Bento do Sapucaí** : —
- São Roque** : — W. C. Ribas.
- Tatuf** : — D. M. Correia.
- Tietê** : — V. Gonçalves de Oliveira.
- Tupi** : — A. Frota.
- Ubatuba** : — Natal de Assis Correia.
- Campo de Demonstração de Fumo "Ricardo Azzi"** : — C. Roessing.

IMPRIMIU:
INDÚSTRIA GRÁFICA SIQUEIRA S. A.
R. AUGUSTA, 235 - SÃO PAULO